ORSAY
Série A,
N° d'ordre :
143

THÈSE

PRESENTEE

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE

PAR

YVONNE GUILLOU

SUJET : Isolement et identification de trois nouvelles bases guanidiques substituées biologiques et d'un nouveau phosphagène chez des vers marins.

Soutenue le 5 Mars 1973 devant la Commission d'examen

MM. LEDERER — Président.
VILKAS
NGUYEN VAN THOAI
Mme ROBIN — Examinateurs.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE TROIS NOUVELLES BASES GUANIDIQUES SUBSTITUEES BIOLOGIQUES ET D'UN NOUVEAU PHOSPHAGENE CHEZ DES VERS MARINS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A Monsieur le Recteur Jean Roche,

Professeur honoraire au Collège de France,

Membre de l'Institut,

En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur Nguyen van Thoai,

Directeur de recherche au C.N.R.S.,

Directeur du laboratoire de Biochimie marine de l'E.P.H.E.,

qui m'a accueillie dans son équipe avec toute sa bienveillance et dont les précieux conseils et les encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail. Qu'il veuille bien croire à mes sentiments de respectueuse reconnaissance.

A Madame Yvonne Robin,

Directeur adjoint du laboratoire de Biochimie marine de l'E.P.H.E.,

qui m'a initiée au travail de recherche et qui m'a prodigué ses conseils et ses encouragements avec une affectueuse bienveillance pendant la préparation de ce travail. Qu'elle me permette de lui exprimer ici toute mon affectueuse reconnaissance et mes plus vifs remerciements.

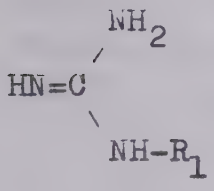
A Monsieur le Professeur E. Lederer
qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence
de cette thèse,

A Monsieur le Professeur M. Vilkas
qui, avec une grande bienveillance, a accepté d'examiner
ce travail,

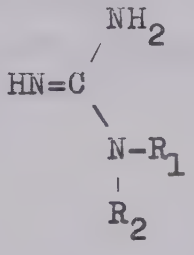
j'adresse mes respectueux remerciements.

I N T R O D U C T I O N

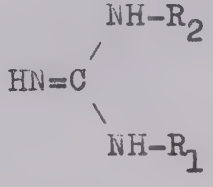
Les guanidines substituées biologiques connues actuellement sont des dérivés de la guanidine, résultant de la substitution d'un, deux ou trois atomes d'hydrogène. Elles répondent aux formules générales :



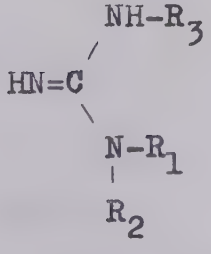
Dérivé monosubstitué



Dérivé disubstitué disymétrique



Dérivé disubstitué symétrique



Dérivé trisubstitué

Chez les vers (annélides, sipunculiens, échiuriens), auxquels nous limiterons cette introduction, les guanidines substituées présentes dans les tissus sont

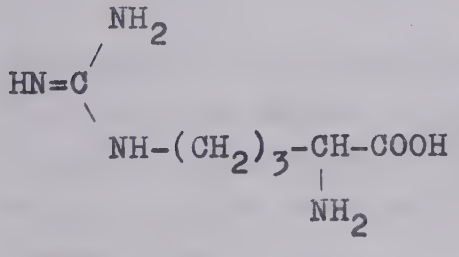
d'une extrême variété et jouent un rôle biologique important, en participant à diverses voies métaboliques.

STRUCTURE DES DERIVES GUANIDIQUES DES VERS

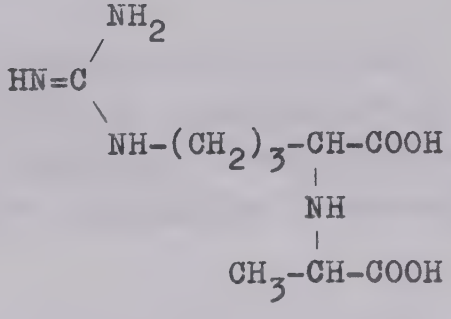
I) Bases guanidiques

Chez les vers, la plupart des bases guanidiques connues sont des dérivés monosubstitués. Comparativement à celles des autres invertébrés, elles ont des structures particulièrement variées. Cependant il est possible de les rattacher plus ou moins directement à des composés biologiques connus : acides aminés, amines ou produits de leur métabolisme.

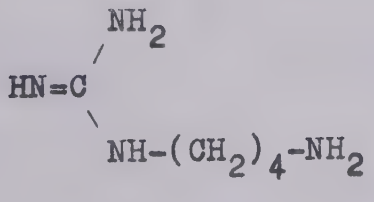
L'arginine (I), elle-même le plus répandu des dérivés guanidiques, participe à la structure de l'octopine (II) par sa condensation réductive avec l'acide pyruvique, et ne diffère de l'agmatine (4-amidinobutylamine) (III) que par la présence du groupement carboxylique.



(I) (arginine)

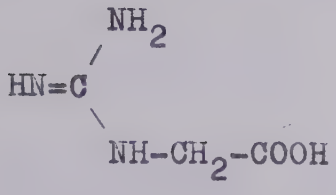


(II) (octopine)

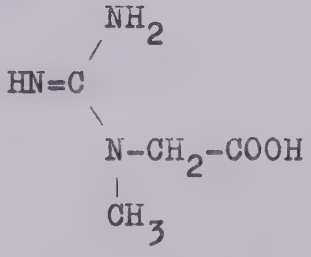


(III) (agmatine)

La glycocyamine (acide guanidoacétique) (IV) et la créatine (acide N-méthylguanidoacétique) (V) se rattachent toutes deux à la glycine.

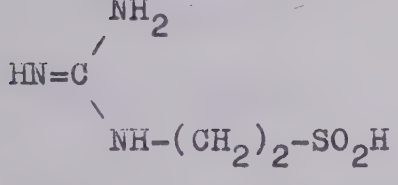


(IV) (glycocyamine)

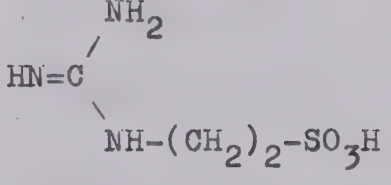


(V) (créatine)

La cystéine est à l'origine de l'hypotaurocyamine (amidinohypotaurine) (VI) et de la taurocyamine (amidinotaurine) (VII).

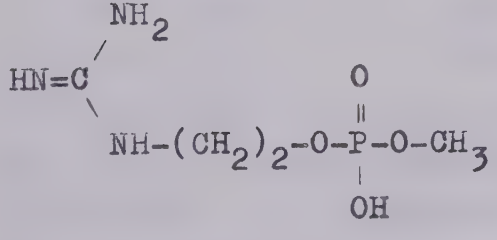


(VI) (hypotaurocyamine)

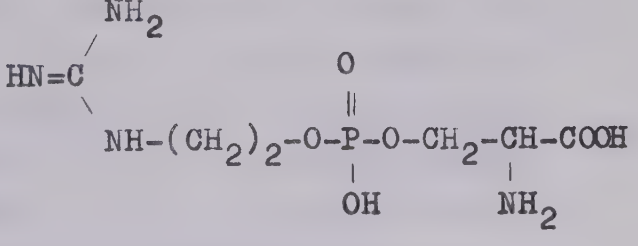


(VII) (taurocyamine)

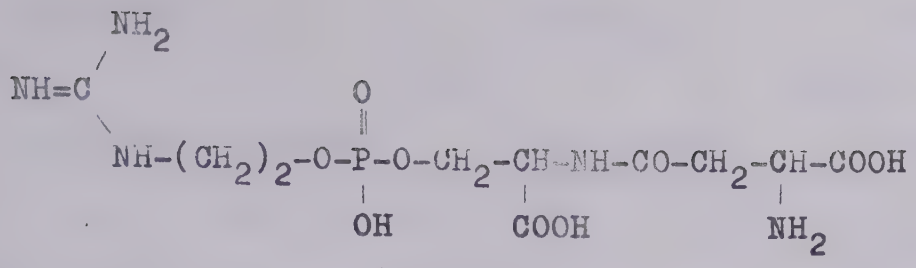
Les esters de l'acide guanidinoéthylphosphorique sont issus de la sérine : l'ophéline (acide 2-guanidinoéthylméthylphosphorique) (VIII), la lombricine (2-guanidinoéthylphospho-O-sérine) (IX) et la bonellidine (β-aspartyllombricine) (X).



(VIII) (ophéline)

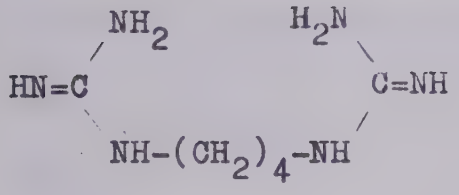


(IX) (lombricine)

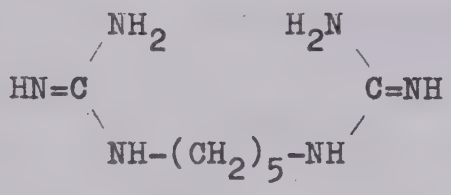


(X) (bonellidine)

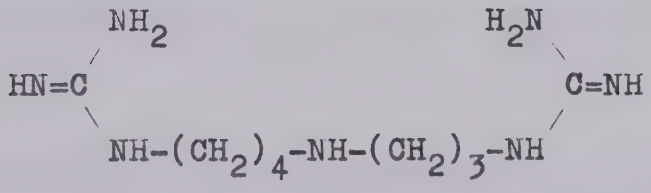
D'autres bases guanidiques se rattachent par leur structure aux diamines correspondantes : c'est le cas de l'arcaïne (diamidinoputrescine) (XI), de l'audouine (diamidinocadavérine) (XII) et de l'hirudonine (diamidinospermidine) (XIII).



(XI) (arcaïne)



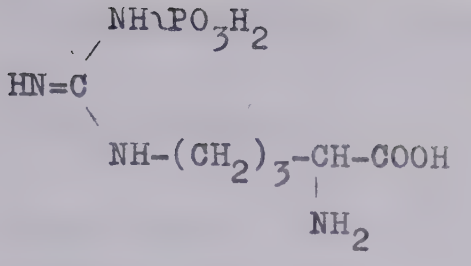
(XII) (audouine)



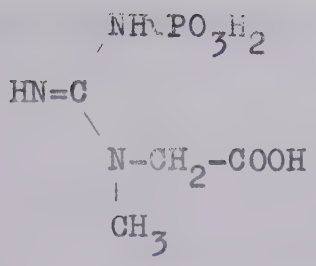
(XIII) (hirudonine)

II) Phosphagènes

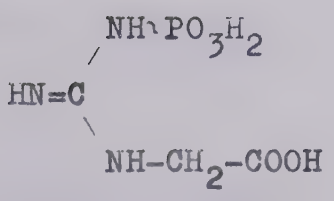
Sept de ces guanidines substituées peuvent être phosphorylées en N' , donnant naissance aux phosphagènes correspondants : la phosphoarginine (XIV), la phosphocréatine (XV), la phosphoglycocyamine (XVI), la phospholombricine (XVII), la phosphoophéline (XVIII), la phosphohypotaurocyamine (XIX) et la phosphotaurocyamine (XX)



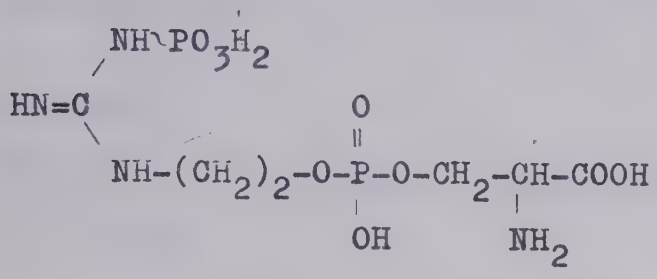
(XIV)(phosphoarginine)



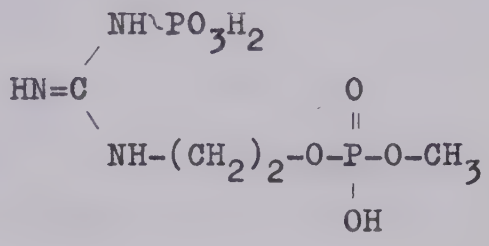
(XV)(phosphocréatine)



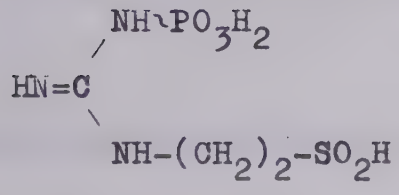
(XVI)(phosphoglycocyamine)



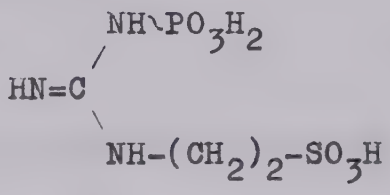
(XVII) (phospholombricine)



(XVIII)(phosphoophéline)



(XIX)(phosphohypotaurocyamine)



(XX)(phosphotaurocyamine)

BIOSYNTHESE DES DERIVES GUANIDIQUES CHEZ LES VERS

a) Biogénèse de l'arginine

Les divers travaux poursuivis chez Lumbricus terrestris ont permis de conclure à l'existence, chez les vers, d'un cycle de KREBS-HENSELEIT actif pour la synthèse de l'arginine (1) , (2). Chez Arenicola marina, THOAI et coll. (3) ont obtenu de la citrulline à partir de carbamylphosphate et d'ornithine.

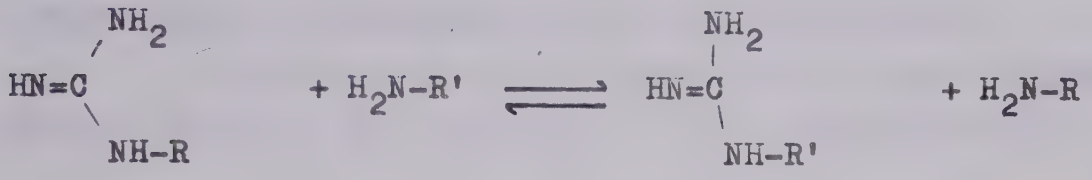
b) Biogénèse des autres bases guanidiques

Ces composés dérivent presque tous de l'arginine : par transamidination, par condensation de l'arginine avec

l'acide pyruvique, ou par décarboxylation de l'arginine.

Transamidination

Chez les vers, la plupart des guanidines substituées résultent du transfert enzymatique du groupement amidine de l'arginine sur un acide aminé ou une amine, selon le schéma de BERGMANN & ZERVAS (4), confirmé par BLOCH & SCHOENHEIMER (5) ; et BORSOOK & DUBNOFF (6).



Cette réaction a été démontrée, in vivo, chez les vers, à l'aide de produits marqués. (Tableau I)

Tableau I

Réactions de transamidination mises en évidence chez les vers

Donneur d'amidine	Accepteur d'amidine	Produit formé	Références
Arginine	2-aminoéthyl-phospho-O-sérine	2-guanidinoéthyl-phospho-O-sérine (Lombricine)	(7)
Arginine	Hypotaurine	Hypotaurocyamine	(8)
Arginine	Glycine	Glycocyamine	(9)
Arginine	Putrescine	Arcaïne	(10)(11)
Arginine	Cadavérine	Audouine	(9)
Arginine	Spermidine	Hirudonine	(12)(11)

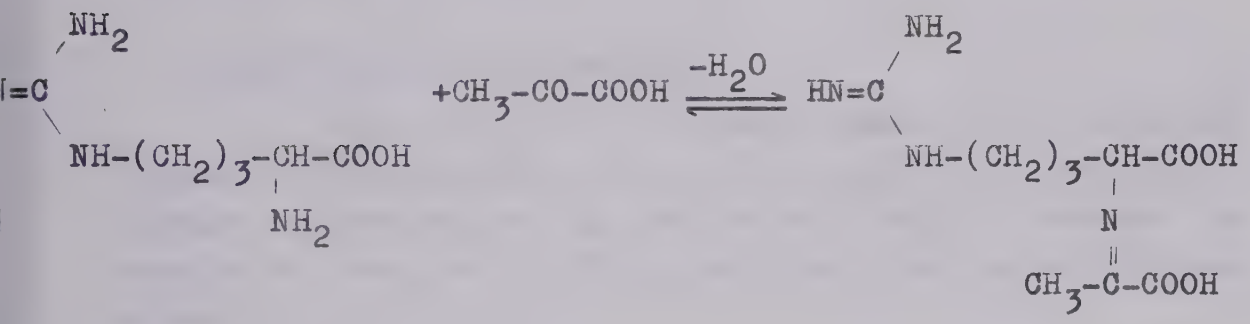
Le dérivé guanidique est formé directement par transfert du groupement amidine de l'arginine sur l'amine correspondante (Tableau I), ou indirectement, par trans-

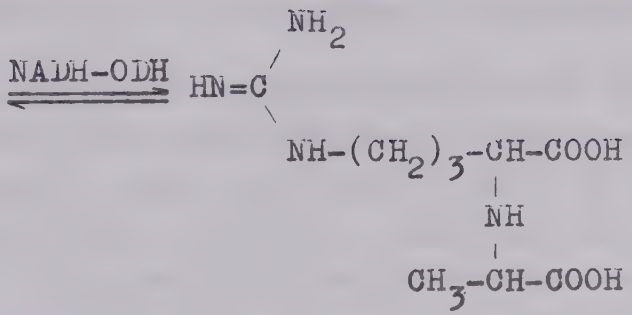
formation ultérieure du produit de la transamidination ; c'est le cas de la taurocyamine, qui provient de l'oxydation de l'hypotaurocyamine (8), et de la créatine, qui résulte de la N-méthylation de la glycocyamine (9).

La biosynthèse des dérivés diguanidiques s'effectue en deux étapes : il y a formation intermédiaire d'un produit monoguanidique, pour l'arcaïne, la monoamidinoputrescine, pour l'hirudonine, la monoamidinoputrescine (11).

Condensation de l'arginine avec l'acide pyruvique

La formation de l'octopine résulte de la condensation réductive de l'arginine et de l'acide pyruvique :





Il y a formation d'une base de SCHIFF, avec réduction de cette dernière, en présence de NADH et d'octopine déshydrogénase (ODH) (13).

Décarboxylation

La formation de l'agmatine, à l'état de traces chez la sangsue résulte d'une décarboxylation de l'arginine, en présence d'une décarboxylase (14).

Méthylation

Chez les vers la créatine provient d'une N-méthylation enzymatique de la glycocyamine (9), elle-même formée par transamidination à partir de la glycine, comme nous l'avons vu précédemment.

THOAI et coll. (1964) (15) ont mis en évidence, dans le muscle d'Ophelia neglecta, la O-méthylation de l'acide guanidinoéthylméthylphosphorique, in vivo et in vitro, à partir de L-méthionine ($Me^{14}C$), d'ATP et d'acide 2-guanidinoéthylphosphorique. L'ophéline est la seule base guanidique dont on n'ait pu démontrer jusqu'ici l'origine du groupement guanidique (16).

c) Biogénèse des phosphagènes

Chez les vers, sept bases guanidiques (arginine, créatine, glycocyamine, lombricine, ophéline, hypotaurocyamine, taurocyamine) peuvent être phosphorylées dans le muscle, en présence d'ATP : guanidine phosphotransférases, suivant la réaction :

$$\text{BASE GUANIDIQUE} + \text{ATP} \underset{}{\overset{Mg^{++}}{\rightleftharpoons}} \text{PHOSPHAGENE} + \text{ADP}$$

Ces ATP : guanidine phosphotransférases sont des enzymes généralement très spécifiques qui sont surtout actives dans le muscle. Chez les vers, à côté de l'arginine phosphokinase et de la créatine phosphokinase, déjà rencontrées ailleurs, de nouvelles phosphokinases ont été découvertes : la glycocyamine phosphokinase, chez Nereis diversicolor (17), la lombricine phosphokinase, chez Lumbricus terrestris (18), la taurocyamine phosphokinase, chez Arenicola marina (17), l'hypotaurocyamine phosphokinase, chez Phacolosoma vulgare (19) et l'ophéline phosphokinase, chez Ophelia neglecta (20).

REPARTITION DES BASES GUANIDIQUES ET DES PHOSPHAGENES CHEZ LES VERS

A) Dans les groupes zoologiques

Bases guanidiques

La répartition des bases guanidiques dans les différents groupes de vers (annélides, sipunculiens, échiuriens) est donnée dans le Tableau II.

Tableau II

REPARTITION DES BASES GUANIDIQUES CHEZ LES VERS

Guanidines	POLYCHETES errantes	POLYCHETES séden-taires	OLIGO-CHETES	SIPUNCU-LIENS	ECHIU-RIENS	HIRUDI-NEES
Arcaïne	-	+	-	-	-	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Audouine	-	+	-	-	-	-
Bonelli-dine	-	-	-	-	+	-
Créatine	+	+	-	-	-	-
Glycocya-mine	+	+	-	-	-	-
Hirudonine	-	-	+	-	-	+
Hypotauro-cyamine	-	+	-	+	-	-
Lombricine	-	+	+	-	+	-
Octopine	-	-	-	+	-	-
Ophéline	-	+	-	-	-	-
Taurocya-mine	-	+	-	+	-	-

Tous les groupes de vers renferment de l'arginine (21). Ils diffèrent par la répartition des autres dérivés guanidiques.

Le groupe des polychètes est le plus hétérogène ; la plupart des dérivés guanidiques y sont rencontrés. Si les polychètes errantes possèdent uniquement la créatine (22), (23), (24) et la glycocyamine (25), les polychètes sédentaires, en plus de ces deux dérivés, renferment de la taurocyamine (25), de l'hypotaurocyamine (26), de la lombricine (27), de l'ophéline (27), et deux dérivés diguanidiques, l'arcaïne (28) et l'audouine (29).

Le groupe des oligochètes est très homogène : la lombricine (30) est présente chez toutes les espèces (31) ; l'hirudonine a été identifiée chez deux animaux de ce groupe (32), (31).

Certaines hirudinées possèdent de l'hirudonine (33), (31) et de l'arcaïne (34).

Chez un seul sipunculien, Sipunculus nudus, l'octopine a été identifiée (35) ; tous les autres sipunculiens étudiés possèdent de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine (26) et deux dérivés guanidiques, dont la structure n'a pas été établie (36), (21).

Chez les échiuriens, où seules deux espèces animales ont été étudiées, existent chez l'une la lombricine (36) et chez l'autre la bonellidine (37).

Phosphagènes

Les sept phosphagènes actuellement connus ont été caractérisés chez les vers. Leur répartition dans les muscles de ces animaux est schématisée dans le Tableau III, elle est similaire à celle des bases guanidiques correspondantes (Tableau II).

Tableau III

REPARTITION DES PHOSPHAGENES MUSCULAIRES CHEZ LES VERS

ESPECES	PHOSPHAGENES						
	Cr~P	Gly~P	Arg~P	Hyty~P	Ty~P	Lom~P	Oph~P
POLYCHETES							
a) errantes	+	+					
b) sédentaires	+	-	+	+	+	+	+
OLIGOCHETES						+	
SIPUNCULIENS			+	+	+		
ECHIURIENS						+	
HIRUDINEES	0	0	0	0	0	0	0

Cr~P = phosphocréatine
Arg~P = phosphoarginine
Ty~P = phosphotaurocyamine
Hyty~P = phosphohypotaurocyamine
Gly~P = phosphoglycocyamine
Lom~P = phospholombricine
Oph~P = phosphoohéline

La phosphocréatine, unique phosphagène des vertébrés, est assez répandue chez les polychètes (23) , (21) ; la phosphoglycocyamine, identifiée par THOAI et coll. (25), chez Nereis diversicolor, a été retrouvée chez d'autres polychètes errantes (21) ; la phosphotaurocyamine, identifiée par les mêmes auteurs (25), chez Arenicola marina, est retrouvée chez des polychètes sédentaires et des sipunculiens (21) ; la phosphohypotaurocyamine, découverte chez Phascolosoma vulgare, (26) est rencontrée dans les mêmes groupes de vers que la phosphotaurocyamine (21) ; la phospholombricine, mise en évidence pour la première fois par THOAI & ROBIN (30) chez Lumbricus terrestris, est commune à tous les lumbriciens (31), mais est aussi présente chez des polychètes sédentaires (21) et chez un échiurien (36) enfin la phosphoophéline, découverte par THOAI et coll. (27), chez Ophelia neglecta n'a jamais été retrouvée ailleurs.

Aucun phosphagène n'a été mis en évidence chez les hirudinées (21).

Dans certains cas, les animaux d'une même famille peuvent avoir des phosphagènes différents ; ainsi dans la famille des ophélidées, polychètes sédentaires, on trouve de la phospholombricine chez Ophelia bicornis (36), de la phosphoophéline chez Ophelia neglecta (27) et un mélange de phosphoarginine et de phosphocréatine chez Travisia forbezii (38).

B) Dans les tissus

L'étude de la répartition des bases guanidiques et des phosphagènes a été effectuée dans les différents tissus et produits génitaux des vers.

D'une manière générale, le dérivé guanidique du muscle (base du phosphagène) est retrouvé, en petite quantité, dans le tractus et dans les oeufs (36). Toutefois, l'Ophelia neglecta possède dans le muscle, l'ophéline et la phosphoophéline, dans le tractus la lombricine, et dans les oeufs la lombricine et la phospholombricine (27) ; de même chez Audouinia tentaculata, la créatine et la phosphocréatine ont été caractérisées dans le muscle, la glycocyamine, la taurocyamine, l'hypotaurocyamine, l'arcaïne et l'audouine dans le tractus, et la lombricine et la phospholombricine, la glycocyamine, la créatine et la taurocyamine dans les oeufs (28).

Les spermatozoïdes de ces animaux renferment tous de la créatine et de la phosphocréatine (22) , (39), sauf une polychète sédentaire, Sabella pavonina où le phosphagène est la phosphoarginine (40).

ROLE BIOLOGIQUE DES BASES GUANIDIQUES CHEZ LES VERS

Par l'étude de la biogénèse des dérivés guanidiques, on peut dire, d'une façon générale, que leur métabo-

lisme prolonge celui de l'arginine ; ainsi, par l'intermédiaire de l'arginine et des différents acides aminés ou amines, les bases guanidiques contribuent à la fixation et au transfert de l'azote.

Les dérivés guanidiques ont aussi un rôle de régulation en liaison avec d'autres métabolismes mettant en jeu de grandes quantités de produits ; c'est le cas des phosphagènes qui servent à la reconstitution de l'ATP au cours du travail musculaire ; ou celui de l'octopine dans le métabolisme du muscle, permettant le stockage momentané de l'acide pyruvique.

Le rôle biologique des bases diguanidiques telle que l'hirudonine n'est pas connu ; en grande quantité dans le muscle des hirudinées, cette base guanidique ne participe pas à la formation d'un phosphagène.

CONCLUSIONS ET OBJETS DES RECHERCHES

Après cette revue d'ensemble des dérivés guanidiques présents chez les vers, il ressort que les bases guanidiques d'un groupe de vers, celui des échiuriens, restent encore peu connues ; seuls deux individus de ce groupe ont été étudiés : chez l'un a été identifiée la lombricine, déjà rencontrée chez des annélides oligochètes et polychètes, chez l'autre a été découverte une nouvelle base guanidique, voisine de la lombricine, la bonellidine (β-aspartyllombricine). Par ailleurs chez les sipunculiens, à côté de l'hypotaurocyamine et de la taurocyamine, bases de leurs phosphagènes musculaires, il existe deux bases guanidiques dont les structures n'ont pas été établies jusqu'à présent.

Ces faits ont orienté notre travail, d'une part vers l'étude des dérivés guanidiques d'un échiurien Thalassema neptuni et, d'autre part, vers l'identification des bases guanidiques nouvelles présentes chez les sipunculiens.

PLAN DES RECHERCHES

Ce travail est divisé en deux parties :

La première partie a pour objet l'étude des dérivés guanidiques de l'échiurien Thalassema neptuni. Une nouvelle base guanidique, la thalassémine, isolée du muscle de Thalassema neptuni, a été identifiée à la 2-guanidinoéthylphospho-O-(α-N,N-diméthyl) sérine et le phosphagène correspondant, la phosphothalassémine, a été caractérisé. La phosphothalassémine transférase, enzyme responsable de la phosphorylation de la thalassémine a été mise en évidence. Une étape de la biogénèse de la thalassémine a pu être étudiée.

La deuxième partie rend compte de la répartition des bases guanidiques présentes dans les tissus de trois sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum, et de l'isolement de deux nouveaux dérivés guanidiques, la phascoline chez le phascolion et la phascolosomine chez les phascolosomes. Nous avons identifié la phascoline à la N-(3-guanidinopropionyl)-2-hydroxy-n-heptylamine et la phascolosomine à la N-(3-guanidino-isobutyryl)-2-méthoxy-n-heptylamine, Une étude des propriétés optiques de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse a été réalisée.

TECHNIQUES GENERALES D'ETUDE

L'isolement et l'identification des dérivés guanidiques biologiques nouveaux qui font l'objet du présent travail comportent un matériel d'étude et des techniques préparatives et analytiques communes et qui sont réunis dans ce chapitre.

MATERIEL

Produits chimiques et enzymes

La taurocyamine, les acides 2- et 3-guanidinopropioniques, et les isomères (2-guanidino-n,2-guanidinoiso,3-guanidino-n,3-guanidinoiso,4-guanidino-n) de l'acide guanidinobutyrique ont été préparés par amidination des acides aminés correspondants par la S-méthylisothiourée, selon la méthode de SCHUTTE (41), modifiée par THOAI et ROBIN (42). L'acide 2-guanidinoéthylphosphorique et l'ophéline ont été synthétisés selon la méthode décrite par THOAI et coll. (27), et l'hypotaurocyamine par celle de DESVAGES & THOAI (43). Les D- et L-lombricines ont été isolées selon ROBIN (36), l'énianthiomorphe. L- à partir de muscle d'Urechis caupo et l'énianthiomorphe D- à partir de muscle de Lumbricus terrestris. Les 2,4-dinitrophénylhydrazones du

n-hexanal et du formol ont été obtenues par l'action d'une solution saturée de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans l'acide chlorhydrique 2 N sur les aldéhydes correspondants ; la 2,4-dinitrophénylhydrazone du formol a été recristallisée dans l'éthanol par addition d'eau et fondait à 161° (théorie 161°) ; la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'n-hexanal a été purifiée par dissolution dans le méthanol absolu et reprécipitation par l'eau, le produit obtenu fondait à 106°-107° (théorie 107°). Tous les autres produits chimiques utilisés au cours de ce travail étaient des produits commerciaux choisis à leur plus haut degré de pureté.

La lombricine phosphokinase a été isolée à partir de muscle de Lumbricus terrestris, selon la méthode de THOAI et coll. (44).

Animaux

L'échiurien, Thalassema neptuni, a été récolté dans les schistes pourris découverts à marée basse sur la côte de Pénerf (Morbihan). L'annélide polychète, Ophelia bicornis, vivant dans le sable, a été ramassée à Carnac (Morbihan) par faible marée.

Les sipunculiens, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum ont été ramassés dans le sable vaseux découvert par grande marée dans la baie de Térénez (Finistère); un autre sipunculien Phascolion strombi, vivant dans des coquilles vides de Turitelles, a été récolté par draguage dans la baie de Concarneau (Finistère).

METHODES

Traitement des animaux

Les Thalassema neptuni ont été ouvertes longitudinalement ; le muscle, le tractus digestif et, dans certains cas, les oeufs et les spermatozoïdes, ont été recueil-

lis séparément après avoir éliminé le liquide coelomique. Les muscles des Ophelia bicornis ont été recueillis après avoir éliminé le tractus et le liquide coelomique. Les tissus ont été gardés ensuite pendant quelques semaines au congélateur à une température de -20°.

Les phascolions et les phascolosomes ont été utilisés entiers et vivants, le plus rapidement possible après la récolte (isolement de la phascoline et de la phascolosomine) ou disséqués afin de recueillir séparément les différents tissus (muscle et tractus), qui ont été conservés congelés à -20° (dosage des dérivés guanidiques).

Techniques d'extraction et de fractionnement

Après broyage des tissus, les bases guanidiques ont été extraites à chaud par des solutions aqueuses diluées d'acide sulfurique ou d'acide acétique, ou à froid par l'acide trichloracétique. Les extraits ont été fractionnés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions cationiques ; pour cela nous avons utilisé essentiellement les résines Dowex 50 et Amberlite IRC 50, sous forme H^+ ou tamponnée à divers pH, et la cellulose-phosphate. Les composés ont été cristallisés sous forme de base libre, de picrate ou de chlorhydrate. Ces techniques seront détaillées pour chaque cas particulier dans la suite de notre exposé.

Les phosphagènes ont été extraits à froid à -10° par l'acide trichloracétique dilué et isolés sous forme de sel de baryum soluble dans l'eau et insoluble dans l'alcool (36).

Techniques analytiques

A) Chromatographie et électrophorèse

a) Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour la mise en évidence et l'étude de la répartition

des dérivés guanidiques dans les différents tissus des animaux ; les extraits étaient préparés comme suit : les tissus (muscles, tractus, oeufs et spermatozoïdes) étaient homogénéisés avec trois volumes d'acide acétique à 2 % , chauffés cinq minutes au bain-marie bouillant et centrifugés. La chromatographie sur couche mince a également permis de suivre les étapes de purification des nouvelles guanidines monosubstituées et d'identifier certains produits provenant de leur dégradation chimique. Les chromatogrammes, effectués sur couche mince de cellulose ou de silice, sur support de feuille d'aluminium ou de film de plastique, ont été développés dans les solvants suivants :

I Pyridine, alcool isoamylique, acide acétique, eau (80 : 40 : 10 : 40)
II Pyridine, alcool éthylique, ammoniaque à 20 %, eau (30 : 30 : 30 : 10)
III Pyridine, alcool isoamylique, eau (80 : 40 : 70)
IV n-propanol, ammoniaque à 20 % , eau (73 : 20 : 10)
V n-propanol, acide acétique, eau (40 : 10 : 10)
VI n-butanol, acide acétique, pyridine, eau (80 : 20 : 20 : 40).

b) Electrophorèse à haut voltage

Pour déterminer la pureté des dérivés guanidiques isolés, ainsi que la radioactivité incorporée dans la thalassémine, des électrophorèses à haut voltage ont été effectuées ; l'appareil SHANDON, type Gross, utilise la méthode "sandwich" : la bande de papier Whatman n° 1 est pressée entre deux plaques de métal réfrigérées par une circulation d'eau ; plusieurs tampons ont été utilisés :

I Pyridine à 10 % , acide acétique à 0,4 % , pH = 6,5
II Pyridine à 0,5 % , acide acétique à 5 % , pH = 3,5
III Borate de sodium 0,05 M , pH = 9,2

Pour les trois tampons utilisés la tension appliquée était de 5.000 volts pendant 60 minutes.

c) Révélation des chromatogrammes et des électrophorégrammes

Les réactifs de révélation étaient :

pour les dérivés guanidiques monosubstitués, celui de SAKAGUCHI (45), à l'α-naphtol-hypobromite alcalin selon ROCHE et coll. (46) ;

pour les dérivés guanidiques N,N disubstitués, le diacétyl-α-naphtol en milieu alcalin, selon la technique de ROBIN (26) ;

pour les fonctions amines primaires, une solution de ninhydrine à 0,25 % dans du n-butanol saturé d'eau et additionné de 1 % d'acide acétique ;

pour les esters phosphoriques, l'acide molybdique-SH_2 , selon la méthode de HANES et ISHERWOOD (47) ;

pour les dérivés cétoniques, le réactif de JAFFE, au picrate de sodium, selon AMES et RISLEY (48).

B) Dosages

a) Dosage des dérivés guanidiques

Les dérivés guanidiques monosubstitués ont été dosés spectrophotométriquement par la réaction au diacétyle-α-naphtol en milieu alcalin selon la méthode de ROSENBERG et coll. (49). Une courbe de référence a été établie avec une solution titrée au produit pur correspondant.

b) Dosage du phosphagène

Après hydrolyse du phosphagène en milieu chlorhydrique 0,1 N , pendant une minute à 100° , il est possible de doser, soit la base guanidique libérée, par la

méthode de ROSENBERG (49), soit le phosphore libéré, selon celle de THOAI et coll. (44).

c) Mesure de la radioactivité

Les mesures de radioactivité ont été effectuées au spectrophotomètre Packard Tricarb modèle 3003, en scintillation liquide, en utilisant le mélange de BRAY (50).

DETERMINATIONS DE STRUCTURES

Les structures des produits isolés ont été déterminées par des méthodes chimiques et physiques.

A) Méthodes chimiques

a) Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire des produits naturels a été effectuée par un service spécialisé. Elle a permis d'établir leur formule brute et de faire des hypothèses de structure.

b) Etude des fonctions

La plupart des réactions d'identité des fonctions ont été effectuées après chromatographie des composés naturels ou de leurs produits de dégradation, selon les techniques de révélation exposées plus haut (p. 19). Il faut y ajouter deux réactions en tubes : la réaction de DUBIN (51), au dinitrofluorobenzène, qui a permis d'établir le degré de substitution des fonctions amines, et celle à l'acide périodique mettant en évidence les positions relatives d'une fonction amine et d'une fonction alcool, selon MALAPRADE (52).

c) Techniques de dégradation

Les dégradations des produits naturels ont été faites par :

hydrolyse - des hydrolyses acides (acide chlorhydrique ou sulfurique à différentes molarités) à 100° ont été effectuées pendant un temps plus ou moins long sur les composés guanidiques, chromatographiquement purs ;

oxydation - plusieurs oxydants ont été utilisés :

1°) le permanganate de potassium à 2 % dans l'acide sulfurique N ,

2°) un mélange sulfochromique selon HEILBRON et coll. (53),

3°) l'acide périodique à 1 %.

B) Méthodes physiques

a) Point de fusion

Les points de fusion des composés naturels ont été déterminés à l'aide d'un microscope à point de fusion ou au tube de TILL ; lorsque cela nous a été possible, ils ont été ensuite contrôlés après mélange intime avec les produits de synthèse correspondants (point de fusion mixte).

b) Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés au polarimètre ELMER modèle 141, sur des solutions aqueuses des produits à étudier, à une concentration d'environ 10 mgr par ml et à une température de 25-26°.

c) Spectres

Différentes sortes de spectres ont été établis :

1°) Les spectres infrarouges ont été enregistrés à l'état solide (KBr , nombre d'onde en cm^{-1}), à l'aide d'un appareil PERKIN-ELMER. Ils sont dûs à Madame Michèle MASURE (Collège de France).

2°) Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur des solutions dans $(CD_3)_2SO$

(étalon interne HMS, déplacements chimiques en p.p.m.) à l'aide d'un appareil VARIAN HA 100. Ils sont dûs à Madame Liliane LACOMBE (Collège de France).

3°) Les spectres de masse ont été établis dans le service du Professeur MOLHO (Muséum), à l'aide d'un spectromètre TSN.218.

PREMIERE PARTIE

ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET BIOGENESE D'UN NOUVEL ESTER DE L'ACIDE GUANIDINOETHYLPHOSPHORIQUE ET DU PHOSPHAGENE CORRESPONDANT, PRESENTS CHEZ UN ECHIURIEN, Thalassema neptuni.

INTRODUCTION

Au cours de ces dernières années l'étude des guanidines monosubstituées a été abordée chez les échiuriens ; c'est ainsi que ROBIN (36) a isolé la guanidinoéthylphospho-O-sérine (lombricine) chez Urechis caupo et THOAI et coll. en 1967 (37) ont pu isoler et identifier la p-aspartyllombricine, appelée bonellidine chez Bonellia viridis.

Au cours de ce travail nous avons étudié la répartition des guanidines monosubstituées présentes dans les différents tissus d'un troisième échiurien, Thalassema neptuni. L'isolement et l'identification d'une nouvelle base guanidique, qui a été appelée thalassémine, ainsi que du phosphagène correspondant, la phosphothalassémine, ont pu être réalisés. Une des étapes de la biosynthèse de la thalassémine a été établie, in vivo, à partir d'un précur-

seur marqué. Enfin l'existence de la phosphagène kinase effectuant la phosphorylation réversible de la thalassémine a été démontrée, et quelques propriétés de l'enzyme ont été étudiées.

PARTIE EXPERIMENTALE

Isolement de la thalassémine des muscles de Thalassema neptuni

84 gr de muscles de Thalassema neptuni, congelés, ont été broyés au mixeur Sorvall avec trois volumes d'acide acétique à 2 % (3 ml/gr de tissu frais) pendant une minute. L'homogénat a été alors porté au bain-marie bouillant pendant cinq minutes, après refroidissement et centrifugation, le liquide surnageant a été gardé et le résidu lavé deux fois par un volume d'acide acétique à 1 % (1 ml/gr de tissu frais) suivant le même protocole.

L'extrait et les lavages réunis et additionnés d'un égal volume d'eau désionisée ont été filtrés sur une colonne (1,8 x 38 cm) de Dowex 50W-X2, 100-200 mesh, forme H^+, qui fixe la thalassémine. La colonne a été ensuite lavée à l'eau désionisée, puis la thalassémine a été éluée de la résine par de l'ammoniaque N. Des fractions de 5 ml ont été recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince dans le solvant II. Les fractions contenant la thalassémine ont été réunies et concentrées à sec sous pression réduite.

Le résidu a été repris par 7 ml d'un mélange pyridine 0,04 M-acide formique 0,4 M pH=2,6, et ajusté à pH=2,6 par de l'acide chlorhydrique concentré. Après avoir éliminé l'insoluble par centrifugation, la solution a été filtrée sur une colonne (3,2 x 65 cm) de Dowex 50W-X4, 200-400 mesh, forme pyridinium, équilibrée dans un mélange de pyridine 0,04 M- acide formique 0,4 M pH=2,6, selon ROBIN (36). La colonne a été développée par le même mélange à pH=2,6, en recueillant l'effluent par fractions de 10 ml à une vitesse d'écoulement de 120 ml/heure; la sortie de la thalassémine, qui, sans être fixée, était freinée sur la résine, a été suivie par chromatographie sur couche mince et a été observée à la fin du passage du

deuxième volume du mélange à pH=2,6. Les fractions contenant la thalassémine ont été réunies et concentrées à sec sous pression réduite.

Le résidu sec a été dissous dans 1 ml d'acide acétique 0,05 M, et cette solution a été filtrée sur une colonne (1,25 x 42 cm) de cellulose-phosphate, forme H^+, équilibrée dans l'acide acétique 0,05 M ; l'effluent a été recueilli par fraction de 2 ml, le débit étant de 20 ml à l'heure. Les fractions 36 - 71 contenant la thalassémine chromatographiquement pure ont été réunies et concentrées sous pression réduite.

La thalassémine pure a été recristallisée plusieurs fois dans du méthanol à 80 % ; 50 mgr de thalassémine fondant à 184° et de pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26}$ = -11°2 (c = 0,980 dans l'eau) ont été obtenus.

Isolement de la phosphothalassémine brute des muscles de Thalassema

10 gr de muscles de Thalassema neptuni ont été broyés au mortier avec deux volumes d'acide trichloracétique à 10 % (2 ml par gr de tissu frais), refroidi à -10° ; le surnageant a été gardé et neutralisé immédiatement, et le résidu a été lavé par un volume d'acide trichloracétique à 5 %, (1 ml/gr de tissu frais) suivant le même protocole. L'extrait et les lavages ont été réunis et neutralisés à la soude en présence de phénolphtaléine, puis additionnés de $BaBr_2$ à 20 %, (0,2 ml/gr de tissu frais) ; le précipité formé après une heure à 0° a été éliminé par centrifugation. L'extrait, alors placé à -10°, a été additionné de quatre volumes d'alcool éthylique à 95°, refroidi lui-même à -10° ; après une nuit le précipité formé a été recueilli par centrifugation, puis lavé à l'alcool-éther et séché sous vide. Le précipité ainsi obtenu a été analysé par chromatographie sur couche mince, avant et après hydrolyse chlorhydrique pendant une minute à 100° : beaucoup de thalassémine libre était présente dans le pré-

cipité brut et pour pouvoir mettre en évidence la phosphothalassémine, le précipité de baryum a dû être purifié.

La totalité du précipité obtenu a été extraite successivement par 1 ml et 0,5 ml d'eau glacée. Les extraits réunis ont été additionnés de 0,2 ml de $BaBr_2$ à 20 % et maintenus à pH alcalin par de la soude en présence de phénolphtaléine ; au bout de trente minutes à 0° le précipité formé a été éliminé par centrifugation. Au surnageant placé à -10°, il a été ajouté un volume d'alcool éthylique refroidi à -10° (1,5 ml) ; après 15 minutes le précipité formé a été recueilli, lavé par de l'alcool-éther et séché sous vide. 116 mgr de précipité de baryum ne contenant plus de thalassémine libre ont été obtenus.

La caractérisation du phosphagène a été effectuée sur 20 mgr du précipité, repris par 0,2 ml d'eau glacée. Après centrifugation, le liquide surnageant a été analysé par chromatographie sur couche mince (solvant II). Les chromatogrammes ont été révélés par la réaction de SAKAGUCHI avant et après chauffage du chromatogramme, (une heure à 85°). De plus, la solution du phosphagène a été chromatographiée avant et après hydrolyse chlorhydrique (HCl 0,1 N, 1 minute à 100°).

Le dosage du phosphagène a été effectué sur 52 mgr du précipité, extraits par 2,8 ml d'eau glacée, après l'élimination du baryum par addition de 0,2 ml de Na_2SO_4 à 10 %. Le précipité de sulfate de baryum a été éliminé par centrifugation. La thalassémine et le phosphate labiles ont été dosés colorimétriquement (voir p. 19) sur des fractions aliquotes du liquide surnageant, après hydrolyse acide (HCl 0,1 N, une minute à 100°), comparativement à des témoins non hydrolysés. La valeur du rapport thalassémine labile/phosphate labile a été établie.

Isolement de la L-lombricine du tractus de Thalassema neptuni

150 gr de tractus congelés de Thalassema ont été broyés au mixeur Sorvall pendant une minute avec deux volu-

mes d'acide acétique à 2 % (2 ml/gr de tissu frais), l'homogénat a été porté au bain-marie bouillant pendant cinq minutes, puis refroidi et centrifugé ; le surnageant a été gardé et le résidu a été lavé deux fois par un volume d'acide acétique à 1 % (1 ml/gr de tissu frais) suivant le même protocole.

L'extrait et les lavages, réunis et additionnés d'un égal volume d'eau désionisée, ont été filtrés sur une colonne (1,96 x 50 cm) de Dowex 50W-X8, 20-50 mesh forme H^+, qui fixait la lombricine. La colonne a été lavée à l'eau désionisée. L'élution de la lombricine a été effectuée par de l'ammoniaque N et suivie par chromatographie sur couche mince. Les fractions contenant la lombricine ont été réunies et concentrées à sec sous vide.

Le résidu sec a été dissous dans 9 ml d'un mélange pyridine 0,04 M- acide formique 0,4 M pH=2,6, et ajusté par de l'acide chlorhydrique concentré à pH=2,6 ; après centrifugation la solution a été filtrée sur une colonne (3,2 x 55 cm) de Dowex 50W-X4, 200-400 mesh, forme pyridinium, équilibrée dans le même mélange à pH = 2,6 ; la colonne a été ensuite développée par deux volumes du mélange à pH = 2,6 (900 ml), puis par deux volumes d'un mélange de pyridine 0,1 M- acide formique 0,3 M à pH = 3,1 ; l'effluent a été recueilli par fractions de 10 ml, à une vitesse d'écoulement de 120 ml/heure, et analysé par chromatographie sur couche mince dans le solvant II . La lombricine sortait à la fin du passage du deuxième volume du tampon à pH=3,1, accompagnée de produits donnant une réaction positive à la ninhydrine. Les fractions contenant la lombricine ont été réunies et concentrées à sec sous pression réduite.

Le résidu sec a été dissous dans 0,8 ml d'acide acétique 0,05 M et la solution a été filtrée sur une colonne (1,25 x 42 cm) de cellulose-phosphate, forme H^+, équilibrée dans l'acide acétique 0,05 M ; la colonne a été développée avec de l'acide acétique à la même concentration en recueillant des fractions de 4 ml ; la lombri-

cine sortait après le passage de 75 ml d'acide, souillée d'impuretés donnant une réaction positive à la ninhydrine. Les fractions qui contenaient la lombricine ont été recueillies et concentrées sous pression réduite.

La lombricine chromatographiquement pure a été obtenue par recristallisations successives de ces fractions dans l'eau et par addition d'alcool éthylique ; la lombricine était moins soluble dans l'alcool que les impuretés, qui se concentraient dans les eaux-mères. 5 mgr de lombricine fondant à 233° et de pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26} = -11°3$ (C = 0,380 dans l'eau) ont été obtenus. Le point de fusion mixte du dérivé des Thalassema avec la lombricine d'Urechis caupo (233°) n'était pas abaissé. Les caractères chromatographiques et électrophorétiques des deux composés étaient identiques.

Isolement de la D-lombricine des muscles d'Ophelia bicornis

25 gr de muscles congelés d'ophelia bicornis ont été extraits de la même manière que les tissus de Thalassema neptuni, d'abord par l'acide acétique à 2 % et puis par l'acide acétique à 1 %.

Les mêmes fractionnements sur les résines que pour la purification de la L-lombricine des tractus de Thalassema neptuni ont été utilisés ; un premier fractionnement a été effectué sur Dowex 50W-X8, 20-50 mesh, forme H^+, (1 ml de résine/gr de tissu), puis sur Dowex 50W-X4, 200-400 mesh, forme pyridinium, équilibrée dans un mélange pyridine 0,04 M- acide formique 0,4 M pH=2,6 (5 ml de résine/gr de tissu) ; enfin une dernière purification a été effectuée sur une colonne de cellulose-phosphate (2 ml de cellulose/gr de tissu).

11 mgr de lombricine chromatographiquement pure et cristallisée, fondant à 229°-230°, et ayant un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26} = +14°4$, (c = 0,917 dans l'eau) ont été obtenus.

Synthèse de la L-thalassémine (α-N,N-diméthyllombricine)

La L-α-N,N-diméthyllombricine a été obtenue par méthylation catalytique de la L-lombricine, selon la méthode de BOWMAN et STROUD (54) qui consiste à convertir les acides aminés en dérivés N,N-diméthylés par condensation réductive avec le formaldéhyde.

67,5 mgr de L-lombricine (0,25 mmole) et 15 mgr de formaldéhyde (0,5 mmole) ont été dissous dans 5 ml d'eau et additionnés de 135 mgr de charbon à 5 % de palladium. Ce mélange a été hydrogéné en l'agitant continuellement pendant 5 heures à la température du laboratoire et à pression atmosphérique ; le charbon a été éliminé par centrifugation et lavé plusieurs fois par de l'acide acétique 0,05 M ; les liquides surnageants contenant beaucoup d'α-N,N-diméthyllombricine et un peu d'α-N-monométhyllombricine, comme le montrait la chromatographie sur couche mince, ont été concentrés à sec sous pression réduite.

Le résidu sec a été dissous dans 0,5 ml d'acide acétique 0,05 M et fractionné sur une colonne (1,1 x 27 cm) de cellulose-phosphate, forme H^+, équilibrée au préalable dans l'acide acétique 0,05 M ; l'α-N,N-diméthyllombricine était exclue de la cellulose-phosphate après le passage d'un volume d'acide de 44 ml, tandis que l'α-N-monométhyllombricine sortait quelques ml plus tard. Les fractions contenant l'α-N,N-diméthyllombricine chromatographiquement pure ont été concentrées sous vide et recristallisées dans du méthanol à 80 %. 35 mgr d'α-N,N-diméthyllombricine ont été obtenus, ayant un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26} = -11°3$ (c = 0,917 dans l'eau) et un point de fusion de 184°. Le rendement de la synthèse était de 44 % ; l'analyse élémentaire donnait les résultats suivants :

Formule théorique $C_8H_{20}N_4O_6P,H_2O$

calculé :	C % = 30,38	H % = 6,69	N % = 17,71	P % =9,79
trouvé :	C % = 30,3	H % = 7,0	N % = 17,6	P % =9,5

Etude de la spécificité des ATP-thalassémine et ATP-lombricine phosphotransférases

L'activité de l'ATP-guanidine phosphotransférase de muscle de Thalassema neptuni a été étudiée sur un extrait brut qui a été préparé ainsi : 1 gr de muscle congelé a été homogénéisé avec 3 ml d'EDTA 10^{-3}M, l'homogénat a été agité pendant 15 minutes à 0°, puis centrifugé à 34.800 g ; le liquide surnageant a été gardé en vue de la détermination de l'activité enzymatique. L'étude de l'ATP-lombricine phosphotransférase a été effectuée sur la protéine purifiée isolée du muscle de Lumbricus terrestris (44).

L'activité enzymatique a été déterminée par le dosage du phosphore labile transféré de l'ATP sur le substrat guanidique dans le sens direct [1] de la réaction :

$$\text{ATP} + \text{GUANIDINE} \underset{[2]}{\overset{[1]}{\rightleftharpoons}} \text{GUANIDINE}\sim\text{P} + \text{ADP}$$

Cette mesure de l'activité enzymatique a été effectuée selon la méthode de THOAI et coll. (44) sauf que le substrat guanidique a été employé à une molarité de 5 µmoles par ml au lieu de 10 µmoles. Les concentrations d'enzymes utilisées pour 1 ml de milieu réactionnel étaient : 0,1 ml d'extrait acellulaire de Thalassema, dilué au 1/75ème dans du tampon glycine-soude 0,05 M pH=8,5 juste avant la mesure de l'activité, pour la thalassémine phosphokinase ou 0,5 µgr de protéine pour la lombricine phosphokinase.

Origine des groupements méthyles de la thalassémine

40 µcuries de [L- Me^{14}C] méthionine (A.S. 50,5 mcuries/mmole) dissoutes dans de l'eau de mer ont été administrées par voie intracoelomique à un lot de 13 Thalassema, de poids total 17 gr. Les animaux ont été gardés dans de l'eau de mer à 6° pendant 24 heures, puis sacri-

fiés en recueillant séparément les muscles et les tractus.

Les tissus (muscles et tractus) ont été extraits par de l'acide acétique selon le protocole décrit pour l'isolement de la thalassémine du muscle (page 25) et les mêmes résines ont été utilisées pour la purification des extraits : la Dowex 50W-X2 , 100-200 mesh, forme H^+ , à raison de 1 ml de résine par gr de tissu frais, puis la Dowex 50W-X4 , 200-400 mesh, forme pyridinium équilibrée dans un mélange de pyridine 0,04 M acide formique 0,4 M pH = 2,6, à raison de 5 ml de résine par gr de tissu frais, et enfin une colonne de cellulose - phosphate, forme H^+ , équilibrée dans l'acide acétique 0,05 M, de 0,8 x 6 cm ; les différentes étapes du fractionnement ont été suivies par chromatographie sur couche mince, dans le solvant II.

La détermination de l'incorporation de la radioactivité a été faite sur la thalassémine chromatographiquement pure, à la sortie de la colonne de cellulose-phosphate. Des comptages de radioactivité en scintillation liquide, ainsi que des dosages de la thalassémine par la méthode de ROSENBERG (49), ont été opérées sur des parties aliquotes (0,01 ml) de chaque fraction de l'effluent, (volume des fractions : 0,3 ml). De plus, la fraction la plus riche en thalassémine a été analysée par chromatographie en couche mince dans le solvant II, et par électrophorèse dans les tampons I, II et III, le volume des dépôts étant de 10 µl : après migration et séchage, les chromatogrammes et les électrophorégrammes ont été révélés par la réaction de SAKAGUCHI pour localiser la thalassémine, puis coupés cm par cm et comptés en scintillation liquide, dans le mélange de BRAY (50).

RESULTATS ET DISCUSSION

Répartition des dérivés guanidiques dans les tissus de Thalassema neptuni

Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique des extraits tissulaires sont donnés dans le Tableau IV.

Tableau IV

REPARTITION DES DERIVES GUANIDIQUES DANS LES TISSUS de Thalassema neptuni

Tissu	BASES GUANIDIQUES			
	Thalassémine	Lombricine	Arginine	Créatine
Muscle	++++	0	0	0
Tractus	0	++	traces	0
Oeufs	0	+	0	0
Spermatozoïdes	0	0	0	++

Trois guanidines monosubstituées ont été caractérisées dans les tissus de Thalassema neptuni ; l'une d'elles, seule présente dans le muscle des animaux, ne possédait aucun caractère chromatographique des dérivés guanidiques connus : le nom de thalassémine lui a été donné. Par contre les deux dérivés guanidiques présents dans le tractus digestif ont été identifiés à des dérivés guanidiques connus, l'arginine et la lombricine. Dans les produits génitaux, la lombricine a été caractérisée dans les oeufs et la créatine dans les spermatozoïdes. Aucune trace de thalassémine n'a été trouvée dans le tractus ni dans les produits génitaux.

Il a été démontré au cours de différents travaux que les dérivés guanidiques présents dans le muscle des animaux jouaient généralement le rôle essentiel d'accepteur de phosphate pendant la contraction musculaire ; la thalassémine, unique base guanidique présente dans le muscle pouvait jouer ce rôle. Comme nous le verrons plus loin, cette hypothèse s'est montrée exacte puisque la phosphothalassémine a pu être isolée du muscle de Thalassema et que la thalassémine est susceptible d'être transphosphorylée par une enzyme présente dans ce même tissu.

Chez les vers, la présence de la lombricine dans le tractus et dans les oeufs, n'est pas un fait exceptionnel. En effet, la lombricine a été trouvée dans le tractus et dans les oeufs de deux annélides Polychètes sédentaires, Audouinia tentaculata (28) et Ophelia neglecta (27), alors que le muscle de ces animaux renferme un dérivé guanidique différent de celui de ces tissus. De même la présence de créatine dans les spermatozoïdes est couramment observée chez les vers (22), (39) ; seuls les spermatozoïdes de deux polychètes sédentaires, Sabella pavonina et Spirographis spallanzanii, possèdent de l'arginine (40).

Par contre, l'existence de trois dérivés guanidiques différents, laissant prévoir la présence de trois phosphagènes différents, dans le muscle, les oeufs et les spermatozoïdes est assez exceptionnelle. En effet, chez les vers marins, la base guanidique et la phosphoguanidine du muscle sont en général les mêmes, soit que celles des oeufs, soit que celles des spermatozoïdes (21) ; la seule exception connue jusqu'ici était constituée par l'annélide polychète sédentaire, Ophelia neglecta, qui renferme l'opnéline et la phosphoophéline dans le muscle, la lombricine et la phospholombricine dans les oeufs et la créatine et la phosphocréatine dans les spermatozoïdes.

Les Thalassema neptuni sont un nouvel exemple de la diversité de la répartition des dérivés guanidiques dans les tissus des vers marins.

Propriétés et structure de la thalassémine

La thalassémine isolée du muscle de Thalassema neptuni, obtenue sous forme de base libre, était un monohydrate donnant de petits cristaux bien homogènes et fondant à 184° ; le produit naturel était lévogyre, ayant un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{26} = -11,2°$ (c = 0,98 dans l'eau) ; il était très soluble dans l'eau et insoluble dans le méthanol et la plupart des solvants organiques.

L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute $C_8H_{20}N_4O_6P,H_2O$.

$C_8H_{20}N_4O_6P,H_2O$

calculé % : C = 30,38 , H = 17,71 , P = 9,79 , H_2O = 5,69

trouvé % : C = 30,9 , H = 18,7 , P =10,2 , H_2O = 5,3

L'étude des caractères analytiques a montré que la thalassémine renfermait dans sa molécule d'une part un groupement guanidique monosubstitué, révélable par la réaction de SAKAGUCHI (46) et d'autre part un groupement phosphorique non labile révélable par le réactif des esters phosphoriques (47) ; elle possédait en outre un groupement azoté ne donnant aucune réaction positive à la ninhydrine, ni au dinitrofluorobenzène (51), ce qui excluait la présence d'une fonction amine primaire ou secondaire dans la molécule de thalassémine.

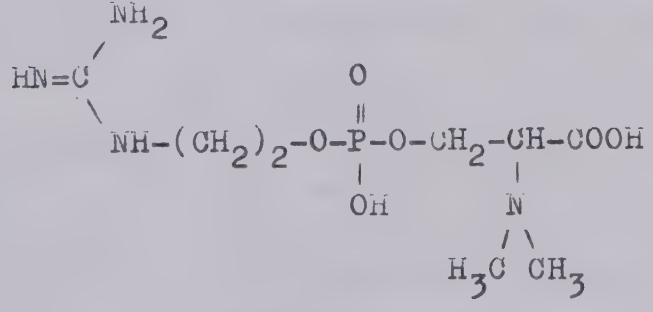
Par hydrolyse chlorhydrique (HCl N à 100°) de la thalassémine il y avait apparition d'un dérivé guanidique monosubstitué au bout de 15 minutes environ ; la formation de ce produit augmentait en fonction du temps alors que la thalassémine disparaissait. Le dérivé guanidique formé a été identifié à l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique par chromatographie sur couche mince dans les solvants I à VI.

L'acide 2-guanidinoéthylphosphorique ayant pour formule brute $C_3H_9N_3O_4P$, le reste de la molécule de la thalassémine avait donc comme formule brute $C_5H_{10}NO_2$, ce

qui suggérait trois possibilités de structure : l'α-méthylthréonine, l'α-N-méthylhomosérine ou l'α-N,N-diméthylsérine ; la dernière hypothèse était la seule compatible avec l'absence de fonction amine primaire ou secondaire dans la thalassémine. Dans ce cas la thalassémine pouvait être la 2-guanidinoéthylphospho-O-(α-N,N-diméthyl)sérine ou α-N,N-diméthyllombricine.

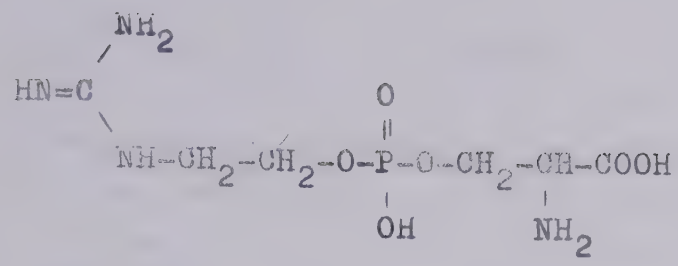
La thalassémine a été comparée à l'α-N,N-diméthyllombricine obtenue par synthèse à partir de la L-lombricine (voir p. 30) ; les deux produits avaient le même point de fusion à 184° et leur point de fusion mixte (184°) n'était pas abaissé. Les pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D^{26} = 11,2°$ pour la thalassémine naturelle et $[\alpha]_D^{26} = -11,3°$ pour l'α-N,N-diméthyllombricine de synthèse étaient similaires ; les deux composés avaient les mêmes caractères chromatographiques et électrophorétiques. Enfin les spectres infrarouges donnés par les deux dérivés guanidiques étaient superposables.

Il était donc possible d'attribuer à la thalassémine la structure de la 2-guanidinoéthylphospho-O-(α-N, N-diméthyl)sérine.

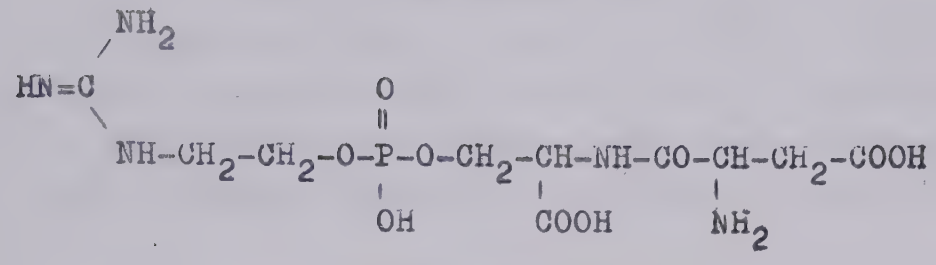


Thalassémine

La structure de la thalassémine, nouvelle guanidine monosubstituée isolée des muscles de Thalassema neptuni, est à rapprocher de celle de la lombricine(2-guanidinoéthylphospho-O-sérine), isolée des muscles d'Urechis caupo par ROBIN (36) et de la bonellidine(2-guanidinoéthylphospho-O-(β-aspartyl)sérine), isolée des muscles de Bonellia viridis, par THOAI et coll. (37).



Lombricine



Bonellidine

Ces trois dérivés guanidiques sont des esters O-sérine de l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique et ne diffèrent que par la nature du substituant du groupement α-aminé de la sérine ; dans le cas de la lombricine ce groupement aminé n'est pas substitué, alors que dans celui de la bonellidine il est monosubstitué par un résidu aspartyle et enfin dans celui de la thalassémine, il est disubstitué par deux groupements méthyles.

A notre connaissance, aucun dérivé α-N-mono ou α-N,N-diméthylé de la sérine n'avait, jusqu'ici, été rencontré dans le monde animal. Chez les bactéries, la N-méthyl-O-méthyl-L-sérine a été identifiée chez divers Mycobacterium par VILKAS, ROJAS et LEDERER (55) et chez les végétaux, l'α-N-monométhyl-sérine a été isolée de Dichapetalum, dont elle constitue l'un des principaux acides aminés libres, par ELOFF et GROBBELAAR . . . (56). Il semble donc que la thalassémine soit le premier dérivé α-N, N-diméthylé de la sérine trouvé dans la nature.

La thalassémine, dont le carbone asymétrique se trouve dans la moitié sérine de la molécule, est lévogyre, contrairement à la lombricine des oligochètes, qui est

dextrogyre et où la présence de D-sérine dans la molécule a été établie (57). Il était donc intéressant de comparer les pouvoirs rotatoires des lombricines isolées des échiuriens, des polychètes et des oligochètes, afin de voir si la D-sérine de la lombricine des oligochètes était ou non spécifique de ce groupe d'animaux.

Les résultats rapportés dans le Tableau V, où sont rassemblés les pouvoirs rotatoires de la thalassémine et des lombricines des divers groupes d'animaux, montrent que les lombricines isolées des échiuriens Thalassema neptuni et Urechis caupo sont lévogyres, comme la thalassémine

Tableau V

POUVOIRS ROTATOIRES DE LA GUANIDINOETHYLPHOSPHO-O-(α-N,N-DIMETHYL)SERINE (THALASSEMINE) ET DES GUANIDINOETHYLPHOSPHO-O-SERINES (LOMBRICINES) DE DIVERSES ESPECES ANIMALES

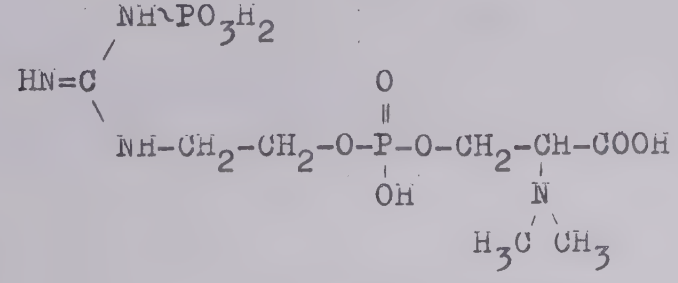
Composé	Origine animale			$[\alpha]_D^{26}$	Références
	Groupe	Espèce	Tissu		
Thalassémine	Echiurien	Thalassema neptuni	Muscle	-11,2°	Ce travail
ombricine	Echiurien	Thalassema neptuni	Tractus	-11,3°*	Ce travail
Lombricine	Echiurien	Urechis caupo	Animal entier	-13,9°	Ce travail
Lombricine	Polychète	Ophelia bicornis	Muscle	+14,°	Ce travail
Lombricine	Oligochète	Lumbricus terrestris	Muscle	+14,4°	Ce travail
Lombricine	Oligochète	Octalasium cyaneum	Muscle	+14,5°	BEATTY & MAGRATH (57)
Lombricine	Oligochète	Allolobophora caliginosa	Muscle	+14,5°	BEATTY & MAGRATH (57)

* Cette valeur n'est qu'approximative en raison de la faible quantité de matériel dont nous disposions.

de Thalassema neptuni, mais que la lombricine de l'annélide polychète Ophelia bicornis est dextrogyre, comme celle des oligochètes. Ainsi, il est à remarquer que seuls les deux échiuriens étudiés, Thalassema neptuni et Urechis caupo, possèdent des composés lévogyres (par suite du manque de matériel il n'a pas été possible de mesurer la rotation de la bonellidine, isolée des muscles de Bonellia viridis) alors que les lombricines des annélides polychète (O. bicornis) et oligochètes (divers Lumbricus, Octalasium et Allolobophora) sont dextrogyres.

Caractérisation de la phosphothalassémine

Une solution du phosphagène a été chromatographiée : aucun dérivé guanidique révélable par la réaction de SAKAGUCHI (46) n'était présent sur le chromatogramme avant chauffage ; par contre, un dérivé guanidique monosubstitué apparaissait après chauffage du chromatogramme, pendant une heure à 85°, pour hydrolyser le phosphagène. Ce produit d'hydrolyse a été identifié à la thalassémine : l'hydrolysat chlorhydrique de la solution du phosphagène a été chromatographié comparativement à une solution de thalassémine ; un seul composé était présent dans l'hydrolysat et migrait au même niveau que la thalassémine. Enfin le rapport µmoles de P labile/µmoles de guanidine monosubstituée établi par les dosages de la moitié guanidique et du phosphate libérés après hydrolyse chlorhydrique du phosphagène a été trouvé égal à 1,04 (théorie = 1,00 par analogie aux autres phosphoguanidines). Il était donc possible d'attribuer la structure suivante au phosphagène du muscle de Thalassema neptuni, c'est-à-dire la N'phosphoryl-2-guanidinoéthylphospho-O-(α-N,N-diméthyl)sérine ou phosphothalassémine



Phosphothalassémine

La caractérisation du nouveau phosphagène, la phosphothalassémine, porte au nombre de six les phosphagènes spécifiques des vers, annélides, sipunculiens, échiuriens, à côté de la phosphocréatine et de la phosphoarginine qui sont trouvées aussi chez d'autres animaux. Deux des six phosphagènes spécifiques, la phosphotaurocyamine et la phosphohypotaurocyamine, sont des dérivés du soufre et trois autres, la phospholombricine, la phosphoophéline, et la phosphothalassémine, sont des dérivés du phosphore ; un élément commun de structure entre ces cinq phosphoguanidines réside dans la longueur de chaîne séparant le radical guanidique du premier groupement acide de la chaîne carbonée qui est égale à $-(CH_2)_2$.

Le groupe des échiuriens se montre particulièrement intéressant puisqu'il a été identifié chez ces animaux deux nouveaux phosphagènes, la phospho L-thalassémine chez Thalassema neptuni et la phospho L-lombricine chez Urechis caupo, qui n'ont été trouvés chez aucune autre espèce ; en effet, nous avons vu précédemment (tableau V) que la lombricine isolée des annélides, oligochètes et polychètes, est dextrogyre.

Caractérisation et propriétés de l'ATP:thalassémine phosphotransférase du muscle de Thalassema neptuni

L'activité de l'ATP:guanidine phosphotransférase de muscle de Thalassema neptuni a été étudiée envers un certain nombre de substrats guanidiques, la thalassémine, les D- et L- lombricines, l'ophéline, la taurocyamine, l'hypotaurocyamine et l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique ; ces guanidines monosubstituées sont des substrats non spécifiques pour un certain nombre d'ATP:guanidine phosphotransférases (56). De plus étant donné la similitude de structure de la thalassémine et de la lombricine, il était intéressant de comparer l'ATP:thalassémine phosphotransférase de Thalassema neptuni et l'ATP:lombricine phosphotransférase de Lumbricus terrestris sur ces mêmes

substrats guanidiques. Les résultats sont donnés dans le Tableau VI.

Tableau VI

COMPARAISON DES ACTIVITES DE LA THALASSEMINE PHOSPHOTRANSFERASE DE T. neptuni ET DE LA LOMBRICINE PHOSPHOTRANSFERASE DE L. terrestris VIS A VIS DES DIFFERENTS SUBSTRATS GUANIDIQUES

Thalassémine kinase		Lombricine Kinase	
Substrat	Activité %	Substrat	Activité %
L-thalassémine	100	D-lombricine	100
L-lombricine	135	L-lombricine	176
Acide 2-guanidinoéthylphosphorique	45	L-thalassémine	88
D-lombricine	40	Taurocyamine	41
Ophéline	10	Acide 2-guanidinoéthylphosphorique	15
Taurocyamine	0	Ophéline	0
Hypotaurocyamine	0	Hypotaurocyamine	0

Dans les deux cas le 100 % d'activité a été calculé pour le substrat naturel. Il existe entre ces deux enzymes certaines similitudes : ces deux transférases sont toutes deux plus actives sur la L-lombricine que sur leur substrat naturel, la L-thalassémine et la D-lombricine respectivement ; les deux enzymes n'ont aucune activité sur l'hypotaurocyamine. Toutefois on relève quelques dissemblances : l'ATP:thalassémine phosphotransférase est active sur tous les esters de l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique ainsi que sur l'acide lui-même, tandis que l'ATP:lombricine phosphotransférase n'a d'action que sur la thalassémine, l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique et la taurocyamine.

Il est donc possible de conclure à l'existence d'une nouvelle enzyme responsable de la phosphorylation de la thalassémine et qui est appelée ATP:thalassémine phosphotransférase.

Origine des groupements méthyles de la thalassémine

L'analyse des extraits tissulaires des animaux ayant reçu la L-[méthyl ^{14}C] méthionine a donné les résultats suivants : comme chez les animaux normaux, le tractus ne renfermait pas de thalassémine ; par contre, la thalassémine isolée du muscle était radioactive. Ceci a été démontré par l'analyse du profil de sortie de la thalassémine de la colonne de cellulose-phosphate, donné dans la figure 1 où ont été portés les résultats des dosages de la thalassémine par la méthode de ROSENBERG (49) et des comptages de la radioactivité en scintillation liquide (50). Il y a concordance parfaite entre le pic de thalassémine et le pic principal de radioactivité. De plus, les résultats des comptages de la radioactivité incorporée dans la thalassémine, effectués après migration en chromatographie sur couche mince ou en électrophorèse à haut voltage (figure 2) montrent que la totalité de la radioactivité est localisée au niveau de la tache de thalassémine révélée par la réaction de SAKAGUCHI.

Au cours de l'étude de la répartition des dérivés guanidiques chez les Thalassema neptuni, (Tableau IV) nous avons remarqué la rigoureuse compartimentation de ceux-ci dans les tissus, la thalassémine se trouvant uniquement dans le muscle et la lombricine dans le tractus digestif. On pouvait donc supposer que la lombricine était le précurseur de la thalassémine et que le dernier stade de la biosynthèse de cette dernière était la méthylation de la lombricine, celle-ci se faisant à partir de la méthionine en passant par l'intermédiaire de la S-adénosyl méthionine, comme c'est le cas dans la biosynthèse de la

créatine chez les vertébrés (59), (5) et chez certains invertébrés (9) :

Bien que nous n'ayons pu le démontrer expérimentalement, le fait de trouver la thalassémine uniquement dans le muscle permet de penser que la méthylation s'opère dans ce tissu. C'est le cas chez l'annélide polychète Ophelia neglecta où l'ophéline (acide 2-guanidinoéthylméthylphosphorique), seul dérivé guanidique du muscle et base du phosphagène, est synthétisée uniquement dans ce tissu : THOAI et coll. (15) ont obtenu in vivo par injection de méthionine marquée, et in vitro par incubation d'acide 2-guanidinoéthylphosphorique, d'ATP et de [$Me^{14}C$] méthionine en présence d'extraits acellulaires de muscle, de l'ophéline marquée sur son groupement méthyle. Notons dans ce dernier cas qu'il s'agit d'une O-méthylation.

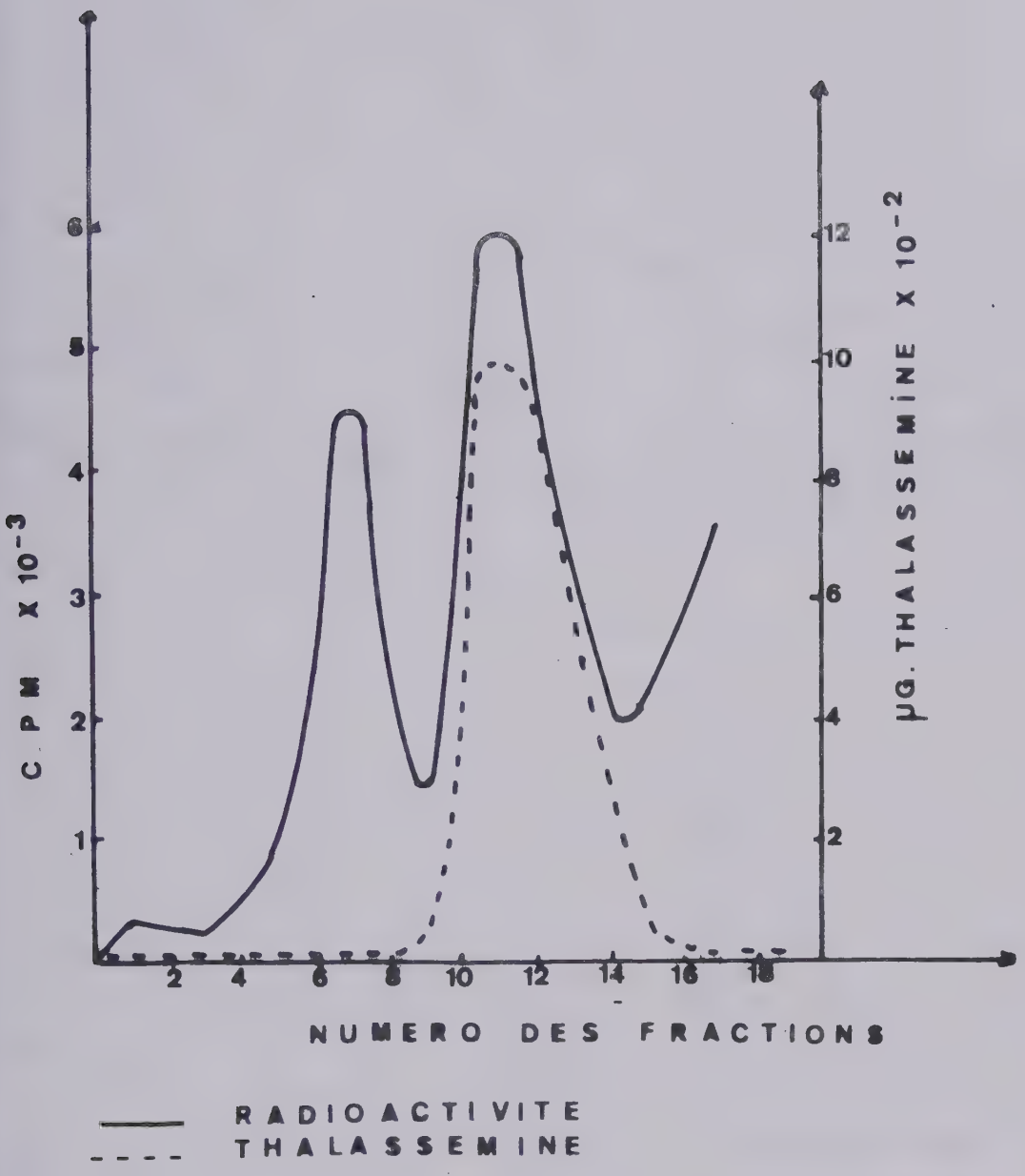


Figure 1

Diagramme de la sortie de la thalassémine de la cellulose-phosphate, forme H^+, équilibrée dans l'acide acétique 0,05 M.

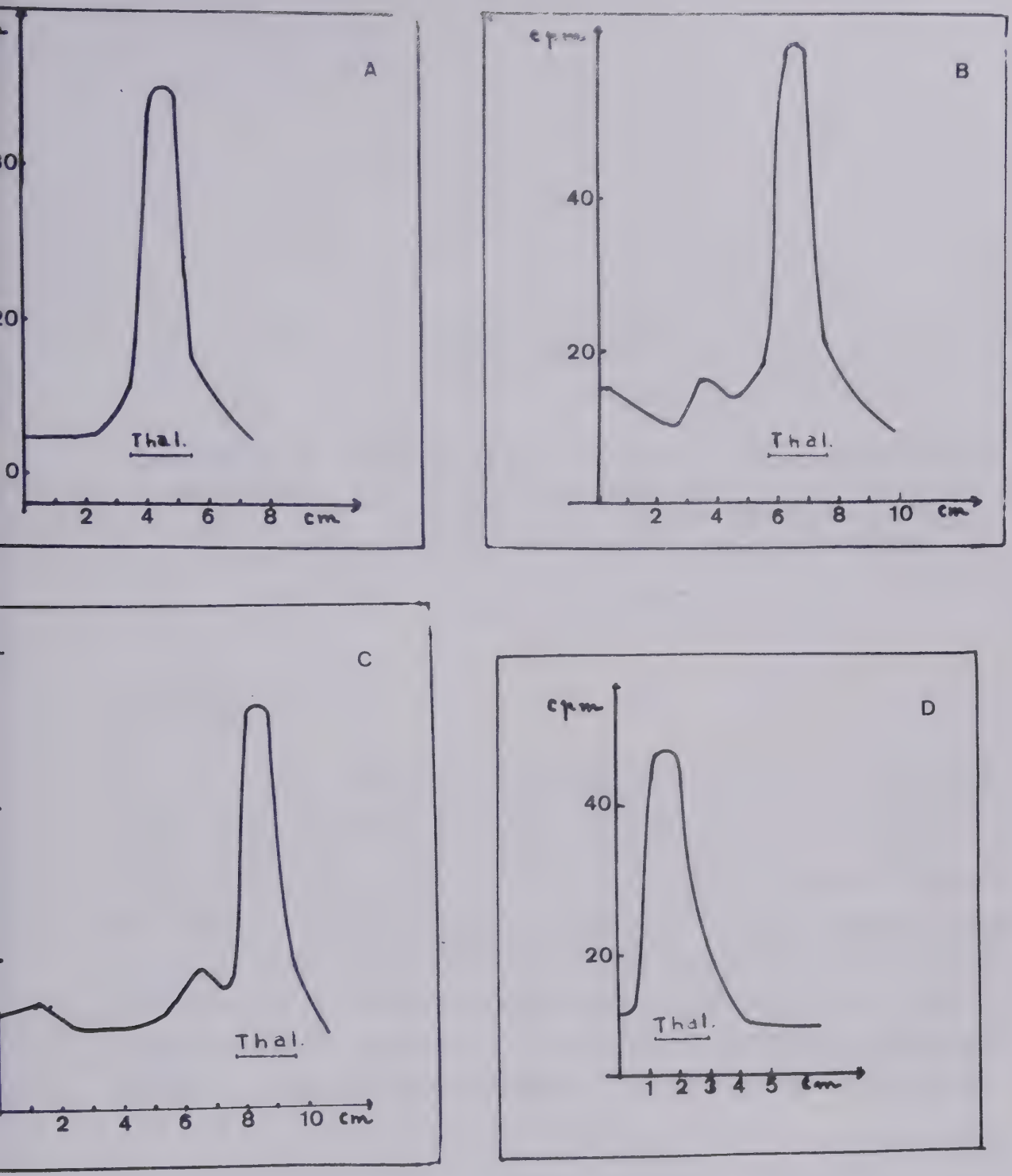


Figure 2

Incorporation de la radioactivité (^{14}C) dans la thalassémine isolée des muscles de Thalassema ayant reçu de la ($Me^{14}C$) méthionine.

A : chromatographie sur couche mince (solvant II)

B : électrophorèse à haut voltage (tampon I)

C : électrophorèse à haut voltage (tampon II)

D : électrophorèse à haut voltage (tampon III)

DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE DEUX DERIVES GUANIDIQUES NOUVEAUX CHEZ LES SIPUNCULIENS, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum.

INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, l'étude des dérivés guanidiques chez les sipunculiens a été abordée. C'est ainsi que ROBIN & THOAI (26) ont isolé et identifié l'hypotaurocyamine et la phosphohypotaurocyamine à partir de muscles de Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum. De plus, ROBIN (36), et THOAI & ROBIN (21) notaient l'existence de deux dérivés guanidiques monosubstitués inconnus dans le tractus de trois sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum.

Au cours du présent travail, nous avons précisé certains aspects de la répartition des dérivés guanidiques dans les tissus des sipunculiens et effectué l'isolement et l'identification des deux dérivés guanidiques nouveaux des tractus. Nous avons nommé phascoline le produit du phascolion et phascolosomine celui des phascolosomes.

Nous décrirons successivement :

- L'étude de la répartition qualitative et quantitative des dérivés guanidiques dans les tissus des sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum.
- L'isolement de la phascoline, de la phascolosomine et des produits de leur hydrolyse acide.
- La détermination de la structure de ces divers composés au moyen de techniques chimiques et physiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

Identification et dosages des dérivés guanidiques dans les tissus des Sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare, Phascoloma elongatum.

Préparation des extraits

Pour l'analyse chromatographique, les extraits tissulaires ont été préparés comme décrit dans "Techniques générales d'étude" (p.1[illegible]).

Pour les dosages les extraits ont été préparés comme suit : 500 mgr de tissu congelé (muscle ou tractus) ont été broyés avec 1,5 ml d'acide trichloracétique à 2% ; l'homogénat a été agité pendant cinq minutes et centrifugé à 34.800 g. Le résidu a été lavé deux fois, par chaque fois 1 ml d'acide trichloracétique à 1 %. Les liquides surnageants ont été réunis et neutralisés à pH = 8 par de la soude N ; après deux heures à +4° , un précipité s'est formé ; il a été éliminé par centrifugation et lavé deux fois par 1 ml de soude 0,01 N. L'extrait est amené à un volume de 10 ml.

Purification et dosages des dérivés guanidiques

Muscle

Hypotaurocyamine et taurocyamine (dosées globalement sous forme de taurocyamine).

5 ml de l'extrait neutralisé (correspondant à 0,250 g de muscle) ont été filtrés sur une colonne (1 ml) d'Amberlite IRC-50,100-200 mesh, forme H^+ ; la résine a été lavée par 10 volumes d'eau distillée ; l'effluent et les lavages ont été réunis et additionnés de 0,15 ml d'eau oxygénée à 5 volumes et portés au bain-marie bouillant pendant cinq minutes (pour l'oxydation de l'hypotaurocyamine

en taurocyamine et l'hydrolyse du phosphagène) ; la solution a été complétée ensuite à 20 ml ; la taurocyamine a été dosée sur une partie aliquote de la solution selon la méthode de ROSENBERG (49).

Phascoline ou Phascolosomine

5 ml de l'extrait neutralisé (correspondant à 0,25 g de muscle) ont été filtrés sur une colonne (1 ml) d'Amberlite IRC-50,100-200 mesh, forme pyridine, tamponnée par un mélange de pyridine M-acide acétique M à pH = 6 , puis éluée par 10 volumes d'acide acétique 2 M dans l'alcool à 50 % ; l'éluat a été concentré sous vide et repris par 5 ml d'eau distillée. Le dosage du dérivé guanidique (la phascoline pour le phascolion, et la phascolosomine pour le phascolosome) a été effectué sur une partie aliquote selon la méthode de ROSENBERG (49).

Tractus

Phascoline ou phascolosomine

10 ml de l'extrait neutralisé préparé comme ci-dessus et correspondant à 0,5 g de tractus a été passé sur une colonne (2 ml) d'Amberlite IRC-50,100-200 mesh, forme H^+. La colonne a été lavée par 10 volumes d'eau distillée, puis éluée par 10 volumes d'acide acétique 2 M dans l'alcool à 50 %. L'éluat acétique, concentré sous vide a été repris par 10 ml d'eau distillée et le dosage de la base guanidique a été effectué sur une partie aliquote de la solution (49).

Contrôle chromatographique : avant dosage, la pureté de chaque fraction a été contrôlée par chromatographie sur couche mince dans le solvant I.

Isolement de la phascoline de Phascolion strombi

500 gr de Phascolion strombi ont été broyés entiers vivants au blendor avec de l'eau distillée (2 ml/gr

d'animaux). L'homogénat, amené à pH = 3 par l'acide sulfurique concentré, a été porté à l'ébullition pendant cinq minutes, puis refroidi et centrifugé ; le liquide surnageant a été réservé. Le culot a été rebroyé au blendor et lavé par de l'eau distillée (1 ml/gr d'animaux) selon le même protocole, en maintenant le pH à 3 par l'acide sulfurique concentré ; le liquide surnageant a été réservé et le culot a été lavé une deuxième fois de la même manière sans rebroyer.

L'extrait et les lavages réunis ont été neutralisés par une solution de baryte saturée à chaud ; le précipité de baryum a été éliminé par centrifugation et lavé plusieurs fois à l'eau distillée.

La totalité de l'extrait neutralisé a été filtrée sur une colonne (3,2 x 75 cm) d'Amberlite IRC-50,100-200 mesh, forme pyridinium, équilibrée dans un mélange pyridine M-acide acétique M ajusté à pH = 7 ; l'hypotaurocyamine et la taurocyamine n'étaient pas fixées, tandis que l'arginine et la phascoline étaient retenues. La colonne de résine a été ensuite lavée par deux volumes du même mélange à pH = 7, puis par deux volumes d'un mélange pyridine M-acide acétique M à pH = 6 ; seule l'arginine a été exclue de la résine. La phascoline a alors été éluée par le passage de dix volumes de pyridine M-acide acétique M à pH = 5 ; l'éluat a été recueilli par fraction de 50 ml et une vitesse de 100 ml/heure. La sortie de la phascoline ainsi que celle des autres dérivés guanidiques a été suivie par chromatographie sur couche mince dans le solvant I, les chromatogrammes étant révélés par la réaction de SAKAGUCHI et par celle à la ninhydrine. La phascoline est sortie seule de la colonne, sans être accompagnée de produits donnant une réaction positive à la ninhydrine. Les fractions contenant la phascoline ont été réunies et concentrées sous pression réduite. 2,250 gr de phascoline brute sous forme de base ont été obtenus.

La purification de la phascoline a été poursuivie par la formation du picrate ; les 2,250 gr de phascoline brute ont été dissous dans 10 ml d'eau distillée et additionnés du même poids d'acide picrique dissous à chaud dans le minimum d'eau distillée ; il s'est formé un précipité qui a été abandonné quelques heures au réfrigérateur, puis recueilli et lavé plusieurs fois à l'eau distillée glacée et séché sous vide en présence de P_2O_5. Le picrate obtenu a été dissous dans 10 ml d'alcool à 95° et additionné de 10 ml d'eau distillée. De belles aiguilles se sont formées au bout d'une nuit au réfrigérateur et ont été recueillies et lavées plusieurs fois à l'eau distillée glacée ; 2,168 gr de picrate de phascoline bien cristallisé, fondant à 73° ont été obtenus.

La phascoline base a été obtenue à partir du picrate par l'élimination de l'ion picrique sur une colonne de résine anionique : 2 gr de picrate de phascoline ont été dissous dans 50 ml d'alcool à 50 % à une température de 60° et passés sur une colonne (1 x 30 cm) de Dowex 1-X10,20-50 mesh, forme Cl^-, équilibrée dans l'alcool à 50 % et thermostatée à 60°. L'acide picrique est resté fixé sur la résine, tandis que la phascoline est passée dans l'effluent ; la résine a été lavée par deux volumes d'alcool à 50 % ; l'effluent et les lavages ont été réunis et concentrés sous vide ; 1 gr de phascoline sous forme de base a été obtenu.

Isolement de la phascolosomine de Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum

600 gr de Phascolosomes ont été extraits de la même façon que les Phascolions, par de l'acide sulfurique dilué à chaud. L'extrait neutralisé par la baryte a été fractionné sur une colonne (3,2 x 75 cm) d'Amberlite IRC-50, 20-50 mesh, forme H^+ ; la taurocyamine et l'hypotaurocyamine passaient à travers la résine ; la colonne a été abondamment lavée à l'eau distillée ; la phascolosomine et

l'arginine ont été éluées par l'acide acétique 2 M dans l'alcool à 50 %. La sortie de la phascolosomine a été suivie par chromatographie sur couche mince dans le solvant I ; la phascolosomine est sortie de la colonne sans être accompagnée de produits donnant une réaction positive à la ninhydrine. L'éluat très sale et jaune a été décoloré sur du charbon actif ; celui-ci a été éliminé par centrifugation. L'éluat a été ensuite concentré sous pression réduite ; après concentration, le résidu encore sale a été dissous dans 230 ml d'eau distillée. La solution a été alcalinisée à pH = 6,8 par de la soude concentrée ; un précipité gélatineux s'est formé et a été éliminé par filtration. La purification de la phascolosomine a été poursuivie par la formation du picrate.

4 gr d'acide picrique dissous dans 200 ml d'eau distillée à chaud ont été ajoutés à la solution de phascolosomine (230 ml) ; le précipité formé à la température du laboratoire a été recueilli après une demi-heure et lavé à l'eau distillée glacée, puis séché sous vide en présence de P_2O_5 . 7,1 gr de précipité obtenus ont été épuisés par de l'alcool absolu, à une température de 60° ; une fraction insoluble importante a été ainsi éliminée. L'extrait alcoolique a été additionné d'un égal volume d'eau distillée ; de beaux cristaux formés après plusieurs jours à la température du laboratoire ont été recueillis, lavés à l'eau distillée glacée et séchés sous vide en présence de P_2O_5. Ces cristaux, formant de belles aiguilles très homogènes, fondaient à 152°. 3 gr de picrate de phascolosomine ont été obtenus.

La phascolosomine base a été obtenue à partir du picrate selon le protocole décrit pour la phascoline (voir p. 49) ; 3,75 gr de picrate dissous à 60° dans l'alcool à 50 % ont été passés sur une colonne (1 x 45 cm) de Dowex 1-X10, 20-50 mesh, forme Cl^- . 2,030 gr de phascolosomine sous forme de base ont été obtenus.

Isolement des produits d'hydrolyse de la phascoline

Des essais préliminaires d'hydrolyse ont été effectués sur 10 mgr de phascoline base, dans un petit ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, en présence de 2 ml d'acide chlorhydrique N ou 2 N, à 100° ; l'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur couche mince dans le solvant I, sur des prélèvements effectués après trente minutes, une heure et deux heures de chauffage ; l'hydrolyse a été arrêtée après trois heures de chauffage. Dès le début de l'hydrolyse, il apparaissait un dérivé guanidique monosubstitué révélable par la réaction de SAKAGUCHI, de R_f = 0,35, et un dérivé aminé, révélable à la ninhydrine, de R_f = 0,80. La phascoline de R_f = 0,82 , avait complètement disparu après trois heures d'hydrolyse en présence d'acide chlorhydrique 2 N.

L'hydrolyse chlorhydrique a été effectué sur 1 gr de phascoline base, en vue d'isoler les produits de dégradation.

1 gr de phascoline base a été hydrolysé en présence de 100 ml d'acide chlorhydrique 2N à 100° pendant trois heures. L'hydrolysat a été concentré à sec plusieurs fois sous pression réduite, pour éliminer l'acide chlorhydrique. Le résidu sec a été dissous dans 100 ml d'eau distillée et filtré sur une colonne (1 x 62 cm) de Dowex 50W-X2,100-200 mesh, forme H^+. Les produits d'hydrolyse, qui étaient fixés, ont été élués par l'application d'un gradient logarithmique constitué par 500 ml d'eau distillée dans le réservoir inférieur et par de l'acide chlorhydrique 2,5 N , dans le réservoir supérieur. L'éluat a été recueilli par fractions de 25 ml, à une vitesse de 100 ml par heure. La sortie du dérivé guanidique, suivie par chromatographie sur couche mince dans le solvant I, a été observée dans les fractions 28 à 32. La sortie du dérivé aminé, suivie également par chromatographie sur couche mince dans le solvant I, a été observée dans les fractions 42 à 61. Les fractions contenant respectivement le dérivé guanidique et le dérivé aminé ont été concentrées sous pression réduite.

Le résidu sec, légèrement jaune, contenant le dérivé guanidique sous forme de chlorhydrate, a été dissous dans 10 ml d'eau distillée et décoloré par du charbon actif ; ce dernier a été éliminé par centrifugation et lavé par de l'acide acétique à 1 %. La solution a ensuite été concentrée sous vide. Le résidu sec a été dissous dans 5 ml d'eau distillée et passé sur une colonne (8,2 x 15 cm) de Dowex 50W-X8,100-200 mesh, forme H^+, afin d'éliminer l'acide chlorhydrique. Le produit fixé a été élué par cinq volumes d'ammoniaque 2 M ; l'éluat a été concentré sous vide.

Le résidu sec a été dissous dans 1 ml d'eau distillée et un petit insoluble a été éliminé par centrifugation ; le liquide surnageant a été placé à 0° et additionné de 0,1 ml d'alcool éthylique à 95°. Après une demi-heure, le précipité formé a été recueilli et lavé à l'alcool, puis à l'éther. Les eaux-mères ont été enrichies des lavages à l'alcool éthylique et conservées à 0° ; il s'est formé un deuxième précipité qui a été recueilli de la même façon que précédemment. Les deux précipités ont été réunis et recristallisés dans l'alcool à 50 %. 72 mgr de produit, fondant à 237°, ont été obtenus.

Le résidu sec, légèrement jaune, contenant le dérivé aminé a été dissous dans 10 ml d'eau distillée et décoloré par du charbon actif ; le charbon a été éliminé par centrifugation et lavé par de l'acide acétique à 1 %. La solution obtenue, parfaitement incolore, a été concentrée sous vide. Le résidu sec a été dissous dans 2 ml d'alcool à 95° et la solution, placée à -10°, a été additionnée de 2 ml d'éther. Un précipité cristallisé a été recueilli au bout d'une heure, lavé et séché à l'éther. Dans les eaux-mères, additionnées des lavages à l'éther, il s'est formé un autre précipité, qui a été recueilli de la même manière que précédemment. Les deux précipités ont été réunis et recristallisés plusieurs fois à l'alcool-éther. 240 mgr de cristaux bien homogènes, fondant à 68°, ont été obtenus.

Une hydrolyse sulfurique ménagée a été effectuée dans les conditions suivantes :

200 mgr de phascoline sous forme de base ont été hydrolysés en présence de 50 ml d'acide sulfurique 0,5 N à 100° ; l'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur couche mince, les chromatogrammes étant développés dans le solvant I et révélés par la réaction de SAKAGUCHI et à la ninhydrine. Après trois heures trente d'hydrolyse, lorsqu'il y avait disparition d'environ 50 % de phascoline, la réaction a été arrêtée. L'hydrolysat a été ajusté à pH = 6,5 par une solution de baryte saturée à chaud ; le précipité de sulfate de baryum a été éliminé par centrifugation. La phascoline restante et les produits d'hydrolyse ont été fractionnés sur une colonne (0,9 x 40 cm) de Dowex 50W-X2,100-200 mesh, forme H^+ ; la colonne a été lavée par deux volumes d'eau distillée ; les produits, fixés sur la résine, ont été élués par l'application d'un gradient logarithmique, constitué par 50 ml d'eau distillée et de l'acide chlorhydrique 2,5 N ; l'éluat a été recueilli par fraction de 2 ml à une vitesse de 60 ml par heure. Le dérivé guanidique est sorti dans les fractions 22 à 31, l'amine de 34 à 51 et enfin la phascoline de 56 à 80 ; les différentes fractions contenant respectivement le produit guanidique, le produit aminé et la phascoline ont été réunies et concentrées sous vide. Le dérivé aminé a été cristallisé dans les conditions décrites précédemment: rendement 20 mgr., point de fusion 68°. Le dérivé guanidique et la phascoline, tous deux sous forme de chlorhydrate, ont été dosés selon la méthode de ROSENBERG (49). 30 mgr du produit guanidique ont été obtenus. Le rendement en phascoline était de 95 mgr.

Isolement des produits d'hydrolyse de la phascolosomine

Des essais préliminaires d'hydrolyse chlorhydrique ont été effectués ; 10 mgr de phascolosomine base ont été mis dans un petit ballon surmonté d'un réfrigérant à

reflux en présence d'acide chlorhydrique 2 N, 4 N et 6 N à 100°. L'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur couche mince dans le solvant I, sur des prélèvements effectués après 2, 4 et 6 heures de chauffage ; les chromatogrammes ont été révélés par la réaction de SAKAGUCHI et à la ninhydrine ; dès les premières heures d'hydrolyse il y avait apparition d'un dérivé guanidique monosubstitué de R_f = 0,49, et d'un dérivé aminé de R_f = 0,87. La phascolosomine, de R_f = 0,89, avait complètement disparu au bout de 6 heures d'hydrolyse dans l'acide chlorhydrique 6 N.

L'hydrolyse chlorhydrique a été effectuée sur 1 gr de phascolosomine sous forme de base, en vue d'isoler les produits de dégradation.

1 gr de phascolosomine additionné de 100 ml d'acide chlorhydrique 6 N a été chauffé pendant 6 heures à 100°. L'hydrolysat a été ensuite séché plusieurs fois sous vide, puis dissous dans 100 ml d'eau distillée. La solution a été passée sur une colonne (1 x 80 cm) de Dowex 50W-X2,100-200 mesh, forme H^+ ; la colonne a été lavée par deux volumes d'eau distillée ; les produits d'hydrolyse, qui ont été fixés par la résine, ont été élués par un gradient logarithmique, constitué par 500 ml d'eau distillée et par de l'acide chlorhydrique 2,5 N. La sortie des produits a été suivie par chromatographie sur couche mince selon la méthode habituelle ; le dérivé guanidique a été observé dans les fractions 32 à 42 et le dérivé aminé dans les fractions 48 à 71. Les fractions contenant respectivement le dérivé guanidique et l'amine ont été réunies et concentrées sous pression réduite.

Le résidu sec contenant le dérivé guanidique sous forme de chlorhydrate a été dissous dans environ 10 ml d'eau distillée. Après décoloration au charbon actif, la solution a été filtrée sur une petite colonne (0,2 x 15 cm) de Dowex 50W-X8,100-200 mesh, forme H^+, afin

d'obtenir le produit sous forme de base ; il était en effet impossible de le cristalliser sous forme de chlorhydrate. La base guanidique a été éluée de la colonne par l'ammoniaque 2 N ; l'éluat a été concentré sous pression réduite. Le résidu sec a été dissous dans 2,5 ml d'eau distillée et un insoluble a été éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant a été additionné d'alcool éthylique à 95° jusqu'à la formation d'un trouble ; un précipité s'est formé lentement à la température du laboratoire ; après 2 heures, ce dernier a été recueilli par centrifugation, puis lavé et séché à l'alcool et à l'éther. Le produit obtenu a été recristallisé plusieurs fois dans l'eau par addition d'alcool. 67 mgr de produit fondant à 260° ont été obtenus.

Le résidu sec, légèrement jaune, renfermant le dérivé aminé a été dissous dans environ 10 ml d'eau distillée et décoloré par du charbon actif ; celui-ci a été éliminé par centrifugation et lavé par l'acide acétique à 1 %. La solution obtenue, parfaitement incolore, a été concentrée sous vide. Le résidu sec a été dissous dans 1,5 ml d'alcool absolu ; après avoir éliminé un insoluble, la solution a été placée à -10°, et additionnée d'éther jusqu'à formation d'un trouble. Après une nuit à -10°, le précipité formé a été recueilli, lavé et séché à l'éther ; dans les eaux-mères, enrichies des lavages à l'éther, il s'est formé un deuxième précipité qui a été recueilli et lavé à l'éther comme précédemment. Les fractions obtenues ont été réunies et recristallisées dans l'alcool, par addition d'éther à -10°. 135 mgr de cristaux bien homogènes, en forme de plaquettes, fondant à 112°, ont été obtenus.

Comme pour la phascoline, une hydrolyse sulfurique ménagée a été effectuée sur la phascolosomine :

200 mgr de phascolosomine sous forme de base ont été hydrolysés en présence de 50 ml d'acide sulfurique 2 N à 100° ; l'hydrolyse a été suivie par chromatographie sur

couche mince, dans le solvant I ; elle a été prolongée pendant six heures. Les produits d'hydrolyse et la phascolosomine ont été fractionnés selon le protocole décrit pour la phascoline. Le produit guanidique et la phascolosomine ont été dosés selon la méthode de ROSENBERG (49) ; le rendement était de 29,5 mgr pour le produit guanidique et de 100 mgr pour la phascolosomine. Le dérivé aminé a été cristallisé sous forme de chlorhydrate fondant à 112°, avec un rendement de 20 mgr.

RESULTATS

Répartition et dosages des dérivés guanidiques dans les tissus des Sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare, Phascolosoma elongatum.

Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique des extraits tissulaires des trois sipunculiens sont donnés dans le tableau VII. Plusieurs guanidines monosubstituées ont été caractérisées dans les tissus de ces animaux.

Tableau VII

Répartition qualitative des dérivés guanidiques dans les tissus des sipunculiens Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare, Phascolosoma elongatum

ANIMAUX	TISSU	BASES GUANIDIQUES						
		Hyty	Ty	Arg	A.3-GP	A.3-GiB	Phine	Phmine
Phascolion strombi	Muscle	+++	++	0	traces	o	+	o
	Tractus	traces	traces	traces	+	o	++++++	o
Phascolosoma vulgare	Muscle	++++	+	0	o	traces	o	+
	Tractus	+	traces	traces	o	+	o	++++++
Phascolosoma elongatum	Muscle	++++	+	0	o	traces	o	+
	Tractus	+	traces	traces	o	+	o	++++++

Abréviations

Hyty=hypotaurocyamine
Ty=Taurocyamine
Arg=Arginine
A.3-GP=Acide 3-guanidinopropionique
A.3-GiB=Acide 3-guanidinoisobutyrique
Phine=Phascoline
Phmine=Phascolosomine

Dans le muscle, les trois vers possèdent de la taurocyamine et de l'hypotaurocyamine, bases des phosphagènes musculaires (21), mais dans des proportions différentes : chez le phascolion, les quantités d'hypotaurocyamine et de taurocyamine sont sensiblement égales, tandis que chez les phascolosomes, l'hypotaurocyamine domine fortement. Les deux dérivés guanidiques nouveaux, la phascoline chez le phascolion et la phascolosomine chez les phascolosomes, sont présents en petites quantités dans le muscle.

Dans le tractus digestif de ces trois sipunculiens, à côté de traces d'arginine et de taurocyamine et d'hypotaurocyamine, on observe des quantités très importantes de phascoline chez le phascolion et de phascolosomine chez les phascolosomes. Il semble que chacun de ces dérivés soit spécifique d'un type de sipunculien donné. Des traces d'acide 3-guanidinopropionique et d'acide 3-guanidinoisobutyrique ont été observées respectivement dans le tractus du phascolion et dans celui des phascolosomes.

Les résultats des dosages des dérivés guanidiques dans les tissus des sipunculiens sont rassemblés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII

DOSAGES DES DERIVES GUANIDIQUES DANS LES TISSUS DES SIPUCULIENS
Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare.

Animal	Tissu	Dérivé guanidique (mgr/100 gr de tissu frais)		
		Hyty + Ty	Phascoline	Phascolosomine
Phascolion strombi	muscle	330	98	0
	tractus	-	615	0
Phascolosoma vulgare	muscle	327	0	92
	tractus	-	0	1.100

Dans le muscle, les bases guanidiques totales (taurocyamine + hypotaurocyamine) sont en quantités équivalentes (environ 300 mgr pour 100 gr de tissu frais) chez le phascolion et le phascolosome. La phascoline du phascolion et la phascolosomine du phascolosome sont également en quantités équivalentes dans ce tissu (environ 95 mgr/100 gr de tissu frais).

Dans le tractus digestif, les deux bases guanidiques nouvelles atteignent des valeurs extrêmement élevées : 615 mgr de phascoline pour 100 gr de tissu frais, chez le phascolion, 1.100 mgr de phascolosomine pour 100 gr de tissu frais, chez le phascolosome. Les autres dérivés guanidiques, présents à l'état de traces, n'ont pas été dosés.

Propriétés de la phascoline et de la phascolosomine

Phascoline

La phascoline, isolée du tractus des Phascolion strombi, a été cristallisée sous forme de picrate, donnant de belles aiguilles jaunes fondant à 73° ; ce picrate était soluble dans l'alcool et insoluble dans l'eau. L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute $C_{17}H_{27}N_7O_9$.

$$C_{17}H_{27}N_7O_9$$

calculé % : C = 43,12 , H = 5,75 , N = 20,70 , O = 30,41
trouvé % : C = 43,2 , H = 5,9 , N = 20,6 , O = 30,3.

La phascoline base était une huile non cristallisable, très soluble dans l'eau et dans les solvants organiques. Elle était lévogyre et avait un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25}$ = -9°1 (c = 1,0 dans l'eau). Sa formule brute était $C_{11}H_{24}N_4O_2$, calculée d'après celle du picrate, après soustraction d'une molécule d'acide picrique.

La phascoline possédait un groupement guanidique monosubstitué révélable par la réaction de SAKAGUCHI ;

elle ne donnait aucune réaction positive à la ninhydrine, ni au dinitrofluorobenzène (51), ce qui excluait la présence d'une fonction amine primaire ou secondaire dans la molécule.

Par hydrolyse acide de la phascoline, il y avait apparition d'un dérivé guanidique, révélable par la réaction de SAKAGUCHI (46) et ne donnant aucune réaction positive à la ninhydrine, et d'un dérivé aminé, révélable par la ninhydrine et ne réagissant pas avec le réactif de SAKAGUCHI. L'hydrolyse était complète après chauffage à 100° pendant trois heures dans l'acide chlorhydrique 2 N.

Phascolosomine

La phascolosomine, isolée des tractus de Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum a été cristallisée sous forme de picrate, formant de belles aiguilles jaunes, ayant un point de fusion de 152° ; ce picrate était soluble dans l'alcool et insoluble dans l'eau. L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute $C_{19}H_{31}N_7O_9$.

$C_{19}H_{31}N_7O_9$

calculé % : C = 45,58 , H = 6,23 , N = 19,54 , O = 28,70
trouvé % : C = 45,56 , H = 6,3 , N = 19,6 , O = 28,6.

La phascolosomine base était une huile non cristallisable, très soluble dans l'eau et dans les solvants organiques ; elle était lévogyre et avait un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25°} = -37°$ (c = 1,0 dans l'eau). Sa formule brute était $C_{13}H_{28}N_4O_2$, calculée d'après celle du picrate par soustraction d'une molécule d'acide picrique.

La phascolosomine renfermait un groupement guanidique monosubstitué, révélable par la réaction de SAKAGUCHI ; elle ne donnait aucune réaction positive à la ninhydrine ni au dinitrofluorobenzène (51) ; la phascolosomine ne possédait donc aucune fonction amine primaire ou secondaire.

Comme la phascoline, la phascolosomine donnait par hydrolyse acide deux dérivés : un dérivé guanidique et un dérive aminé ; mais les conditions d'hydrolyse des deux corps étaient différentes : pour obtenir la coupure totale de la molécule de la phascolosomine il était nécessaire d'utiliser de l'acide chlorhydrique 6 N , pendant 6 heures à 100°.

Structure de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse.

Identification des produits d'hydrolyse de la phascoline

A) Dérivé guanidique

Le dérivé guanidique obtenu par hydrolyse chlorhydrique de la phascoline a été cristallisé sous forme de base, donnant de petits cristaux bien homogènes, fondant à 237° et n'ayant aucun pouvoir rotatoire, soluble dans l'eau et peu soluble dans la plupart des solvants organiques. L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute : $C_4H_9N_3O_2$.

$C_4H_9N_3O_2$

calculé % : C = 36,63 , H = 6,92 , N = 32,04 , O = 24,40
trouvé % : C = 36,8 , H = 7,2 , N = 31,9 , O = 24,3.

Ce dérivé donnait une réaction positive avec le réactif de SAKAGUCHI, donc il possédait un groupement guanidique monosubstitué, et il ne réagissait pas avec la ninhydrine ce qui excluait la présence d'une fonction amine primaire dans la molécule.

D'après ses caractères analytiques, ce dérivé guanidique monosubstitué pouvait être l'acide 2- ou 3-guanidinopropionique ; il a donc été comparé aux acides 2- et 3-guanidinopropionique de synthèse, par chromatographie sur couche mince dans les solvants de I à VI et par élec-

trophorèse dans les tampons I à III (voir Techniques générales d'étude p. 11). Il n'a pas été possible de séparer le produit guanidique isolé de la phascoline de l'acide 3-guanidinopropionique de synthèse.

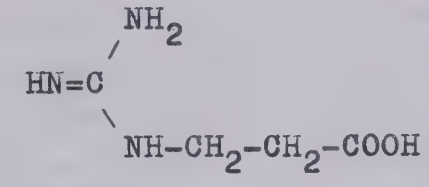
L'acide 3-guanidinopropionique de synthèse avait un point de fusion de 237°, le produit isolé avait le même point de fusion ; le point de fusion du mélange des deux produits n'était pas abaissé (237°).

Le spectre infrarouge donné par le produit isolé de la phascoline était :

ν(N-H et O-H) = 3.330, 3.170, 3.030.
ν(C=O) = 1.675
ν(C=N) = 1.640

Le spectre de l'acide 3-guanidinopropionique de synthèse était identique à celui donné par le produit naturel.

Il était donc possible d'attribuer au dérivé guanidique monosubstitué isolé après l'hydrolyse acide de la phascoline, la structure suivante :



C'est-à-dire celle de l'acide 3-guanidinopropionique.

B) Dérivé aminé

Le dérivé aminé obtenu après l'hydrolyse acide de la phascoline a été cristallisé sous forme de chlorhydrate, donnant de petites plaquettes fondant à 68° ; il était lévogyre, le produit obtenu par hydrolyse chlorhydrique avait un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D^{25} = -6,3°$ (c = 1,0 dans l'eau), et celui obtenu par hydrolyse sulfurique $[\alpha]_D^{25} = -6,6°$ (c = 0,97 dans l'eau). Il était soluble dans l'eau et l'alcool absolu, insoluble dans l'éther. L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute : $C_7H_{17}NO,HCl$.

$C_7H_{17}NO,HCl$

calculé % : C=50,14 , H=10,82, N=8,35 , O=9,54 , Cl=21,15.
trouvé % : C=50,3 , H=10,9 , N=8,7 , O=10,2 , Cl=20,8

La molécule de ce dérivé aminé renfermait une fonction amine primaire, qui a été caractérisée par la ninhydrine et par la réaction au dinitrofluorobenzène (51) ; elle ne possédait pas de groupement guanidique monosubstitué révélable par la réaction de SAKAGUCHI. La molécule contenait un atome d'oxygène.

Par oxydation de ce dérivé aminé au MnO_4K à 2 % dans l'acide sulfurique N, pendant 4 heures, il y avait apparition d'un produit aminé qui a été identifié à la glycine par chromatographie sur couche mince dans les solvants I à VI ; il y avait parallèlement disparition du produit initial. Cette oxydation au MnO_4K a permis de localiser en bout de chaîne la fonction amine dans la molécule du dérivé aminé obtenu par l'hydrolyse acide de la phascoline.

Par oxydation de ce même dérivé au réactif sulfochromique (53), il y avait apparition d'un produit ayant le même R_f que le produit initial dans le solvant I et en électrophorèse dans le tampon I, et réagissant comme lui à la ninhydrine ; le produit formé réagissait en outre avec le réactif de JAFFE (48), probablement par apparition d'une fonction cétone, indiquant la présence d'une fonction alcool secondaire dans la molécule du dérivé aminé obtenu par l'hydrolyse acide de la phascoline.

Pour préciser la position relative des fonctions amine et alcool, nous avons utilisé la réaction d'oxydation à l'acide périodique ; cette réaction est positive dans le cas où les deux fonctions se trouvent sur deux carbones adjacents, selon la réaction suivante :

$$R\text{-}CH(NH_2)\text{-}CH(OH)\text{-}R' + IO_4H \longrightarrow R\text{-}CHO + R'CHO + NH_3 + IO_3H$$

Il y a coupure de la molécule avec formation de deux aldéhydes et d'ammoniac , ce dernier a été caractérisé par le réactif de NESSLER dans le cas du dérivé aminé de la phascoline ; le dérivé aminé donnait donc un test positif à la réaction à l'acide périodique, donc les fonctions alcool et amine se trouvaient sur deux carbones adjacents. Il restait à caractériser la nature des aldéhydes formés.

Isolement et identification des aldéhydes

47 mgr du dérivé aminé ont été additionnés de 50 ml d'une solution d'acide périodique à 1 % , préparée à partir d'acide périodique fraîchement recristallisé, le mélange a été agité pendant 15 minutes à 25°. Les deux aldéhydes formés ont été isolés sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones, après avoir éliminé l'acide périodique sur une colonne (1,5 x 11 cm) de Dowex 1-X10,100-200 mesh, forme Cl^- ; la colonne a été lavée successivement par 20 ml d'eau distillée et par 50 ml de méthanol à 50 % ; des fractions de 3 ml (2 minutes par fraction) ont été recueillies ; chaque fraction a été additionnée d'1 ml d'une solution saturée de 2,4-dinitrophénylhydrazine, dans l'acide chlorhydrique 2 N. Les précipités de 2,4 dinitrophénylhydrazones des aldéhydes ont été recueillis séparément par centrifugation, puis analysés par chromatographie sur couche mince de silicagel, développée dans du benzène. La 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'aldéhyde sorti dans la fraction aqueuse avait le même caractère chromatographique que la 2,4-dinitrophénylhydrazone du formol de synthèse ; la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'aldéhyde sorti dans la fraction méthanolique avait le même caractère chromatographique que la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'n-hexanal de synthèse.

La 2,4-dinitrophénylhydrazone du formol isolée était impure à la sortie de la colonne de Dowex 1-X10 ; elle a été purifiée sur une colonne de silice (2,2 x 21 cm), développée par du benzène ; après avoir éliminé le solvant,

la 2,4-dinitrophénylhydrazone du formol a été recristallisée dans du méthanol par addition d'eau. De belles aiguilles jaunes fondant à 158° ont été obtenues ; le point de fusion de la 2,4-dinitrophénylhydrazone du formol de synthèse était de 161° ; leur point de fusion mixte était de 161°.

La 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'n-hexanal isolé dans la fraction méthanolique à la sortie de la colonne de Dowex 1-X10 était pure chromatographiquement ; elle a été recristallisée dans de l'éthanol à 80 %. De belles aiguilles jaunes, fondant à 106° ont été obtenues ; le point de fusion de la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'n-hexanal de synthèse était de 106° ; leur point de fusion mixte était de 106°.

Le spectre de masse donné par la 2,4-dinitrophénylhydrazone de l'aldéhyde isolé indiquait que l'aldéhyde était bien l'n-hexanal. Les deux aldéhydes isolés après l'oxydation à l'acide périodique du dérivé aminé provenant de l'hydrolyse acide de la phascoline étaient donc le formol et l'n-hexanal.

Etant donné ces résultats, nous pouvons attribuer la structure suivante au dérivé aminé isolé après l'hydrolyse acide de la phascoline :

$$H_2N\text{-}CH_2\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}\text{-}(CH_2)_4\text{-}CH_3$$

c'est-à-dire la 2-hydroxy-n-heptylamine.

Cette structure a été confirmée par le spectre de résonance magnétique nucléaire (Tableau IX) et par le spectre de masse (70 eV) qui montre un pic caractéristique d'une fonction alcool (ion à $[M-18]^+$) , m/e = 113 , 114.

Identification des produits d'hydrolyse de la phascolosomine

A) Dérivé guanidique

Le dérivé guanidique monosubstitué obtenu par hydrolyse chlorhydrique de la phascolosomine a été cristallisé sous forme de base, donnant de petits cristaux bien homogènes ; son point de fusion était de 260°. Ce dérivé était lévogyre et avait un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} = -14°7$ (c = 1,0 dans l'eau). Il était soluble dans l'eau et insoluble dans la plupart des solvants organiques. L'analyse élémentaire a permis d'établir la formule brute : $C_5H_{11}N_3O_2$.

$C_5H_{11}N_3O_2$

calculé % : C = 41,41 , H = 7,65 , N = 28,98 , O = 22,07
trouvé % : C = 40,9 , H = 7,0 , N = 29,0 , O = 22,6.

Ce dérivé guanidique provenant de l'hydrolyse acide de la phascolosomine possédait un atome de carbone de plus dans sa molécule que l'acide 3-guanidinopropionique isolé des produits d'hydrolyse de la phascoline et n'avait pas les mêmes caractères chromatographiques que celui-ci ; mais comme lui, il donnait une réaction de SAKAGUCHI positive, ce qui indiquait qu'un groupement guanidique monosubstitué était présent dans sa molécule, et il ne réagissait pas avec la ninhydrine, ce qui excluait la présence d'une fonction amine primaire.

Par sa composition élémentaire, ce dérivé guanidique monosubstitué pouvait être un des isomères de l'acide guanidinobutyrique ; il a donc été comparé aux différents isomères (2-guanidino-n, 2-guanidino-iso, 3-guanidino-n, 3-guanidino-iso et 4-guanidino-n) de l'acide guanidinobutyrique de synthèse par chromatographie sur couche mince dans les solvants I à VI et par électrophorèse dans les tampons I à III (Techniques générales d'étude p. 17). Le

produit isolé avait les mêmes caractères chromatographiques et électrophorétiques que les deux isomères 3-guanidino-n- et 3-guanidino-iso- de l'acide guanidinobutyrique. Il a finalement été identifié à l'acide 3-guanidino-isobutyrique par son point de fusion (260°, pour le produit naturel, 258° pour celui de synthèse, 260° pour le mélange) et par l'étude de ses spectres.

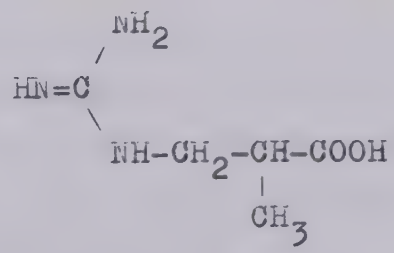
Le spectre infrarouge du produit isolé avait les caractéristiques suivantes :

ν (N-H et O-H) = 3.350, 3.260, 3.050.
ν(C=O) = 1.680
ν(C=N) = 1.630

Le spectre de l'acide 3-guanidinoisobutyrique de synthèse avait les mêmes caractéristiques.

Enfin les spectres de résonance magnétique nucléaire donnés par le produit isolé à partir de la phascolosomine et par l'acide 3-guanidinoisobutyrique de synthèse étaient identiques.

Il était donc possible d'attribuer la structure de l'acide 3-guanidinoisobutyrique au dérivé guanidique monosubstitué provenant de l'hydrolyse acide de la phascolosomine.



acide 3-guanidinoisobutyrique

B) Dérivé aminé

Le dérivé aminé provenant de l'hydrolyse acide de la phascolosomine a été cristallisé sous forme de chlorhydrate, donnant des plaquettes fondant à 112°. Ce dérivé était dextrogyre et avait un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25}$ = +34°8 (c = 0,95 dans l'eau), mesuré sur le produit

provenant de l'hydrolyse sulfurique. Il était très soluble dans l'eau et l'alcool absolu et insoluble dans l'éther. D'après l'analyse élémentaire, la formule brute était : $C_8H_{19}NO,HCl$

$C_8H_{19}NO,HCl$

calculé % : C=52,85 , H=11,09 , N=7,70 , O=8,80 , Cl=19,50
trouvé % : C=52,7 , H=11,1 , N=8,0 , O=8,9 , Cl=19,5

Il est à remarquer que le dérivé aminé isolé après l'hydrolyse chlorhydrique de la phascolosomine possédait un atome de carbone de plus que la 2-hydroxy-n-heptylamine obtenue par l'hydrolyse acide de la phascoline et n'avait pas les mêmes caractères chromatographiques que celui-ci. Mais comme lui il réagissait positivement avec la ninhydrine et donnait les caractéristiques d'une fonction amine primaire à la réaction au dinitrofluorobenzène (51) ; de même il ne donnait aucune réaction positive à la réaction de SAKAGUCHI. Ce produit avait donc une fonction amine primaire, mais aucun groupement guanidique monosubstitué dans sa molécule. Un atome d'oxygène était présent dans ce produit, comme dans la 2-hydroxy-n-heptylamine.

Par oxydation au MnO_4K à 2 %, dans l'acide sulfurique N, pendant 4 heures, il y avait apparition de la glycine mise en évidence par chromatographie sur couche mince ; comme dans le cas de la 2-hydroxy-n-heptylamine, la fonction amine primaire était donc en bout de chaîne.

Les réactions d'oxydation qui avaient permis de mettre en évidence la fonction alcool secondaire de la 2-hydroxy-n-heptylamine ont été étudiées sur ce dérivé aminé. Contrairement à la 2-hydroxy-n-heptylamine, provenant de la phascoline, ce composé ne donnait aucun produit révélable par le réactif de JAFFE (48) après l'oxydation au mélange sulfochromique. De même aucune oxydation du produit aminé de la phascolosomine n'était obtenue par l'oxydation à l'acide périodique.

Le spectre infrarouge était peu caractéristique : ν (C-O) = 1.100.

Le spectre de résonance magnétique nucléaire est décrit dans le Tableau IX.

Par les valeurs données par le spectre de résonance magnétique nucléaire, une fonction méthoxyle pouvait être présente dans la molécule du dérivé aminé.

Pour confirmer chimiquement la présence de cette fonction méthoxyle dans la molécule, le dosage du groupement méthoxy a été effectué :

Calculé % : $O-CH_3$ = 17,08
trouvé % : $O-CH_3$ = 16,2

Il était donc possible de donner la structure suivante au dérivé aminé provenant de l'hydrolyse acide de la phascolosomine :

$$H_2N-CH_2-\underset{\displaystyle O-CH_3}{\underset{|}{CH}}-(CH_2)_4-CH_3$$

c'est-à-dire la 2-méthoxy-n-heptylamine.

Cette structure a été confirmée par le spectre de masse qui montre un pic caractéristique d'une fonction méthoxy (ion à $[M-31]^+$), m/e = 113 , 114.

Structure de la phascoline et de la phascolosomine

Ayant déterminé la structure des produits provenant de l'hydrolyse acide de la phascoline et de la phascolosomine, il était possible de déduire les structures des deux composés guanidiques isolés des tractus digestifs du phascolion et des phascolosomes.

Dans les deux cas il semblait y avoir condensation, avec formation d'une liaison amide, entre le dérivé guanidique et l'amine : c'est-à-dire entre l'acide 3-guanidinopropionique et la 2-hydroxy-n-heptylamine, pour la phascoline, et entre l'acide 3-guanidinoisobutyrique et la 2-méthoxy-n-heptylamine, pour la phascolosomine.

Tableau IX

SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES DERIVES AMINES

Les spectres ont été enregistrés sur un appareil VARIAN HA 100 à 100 MHz dans le DMSO-d_6 avec le HMDS(hexaméthyldisiloxane) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont exprimés en p.p.m.($\delta_{HMDS} = 0$) et les constantes de couplage en Hz ; s, m, désignent respectivement singulet, massif.

Cl^- $^+NH_3 - CH_2 - \underset{\displaystyle OR}{CH} - (CH_2)_4 - CH_3$

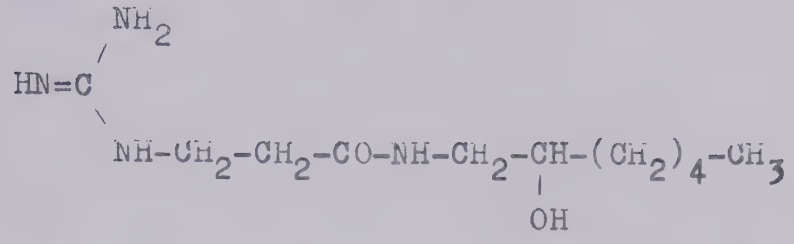
1 2 3 4,5,6,7 8

R	1	2[a] A	2[a] B	3	4,5,6,7	8
H	8(m)	2,46	2,71	3,59(m)(CH) 5,10(m)(OH)	1,20(m)	0,80(m)
		$J_{AB} = 12$				
		$J_{A3} = 8$	$J_{B3} = 2$			
H_3	8,3(m)	2,62	2,80	3,30(m)(CH) 3,20(s)($O-CH_3$)	~1,20(m)	0,80(m)
		$J_{AB} = 13$				
		$J_{A3} = 8$	$J_{B3} = 4$			

[a] AB d' ABX avec H en 3

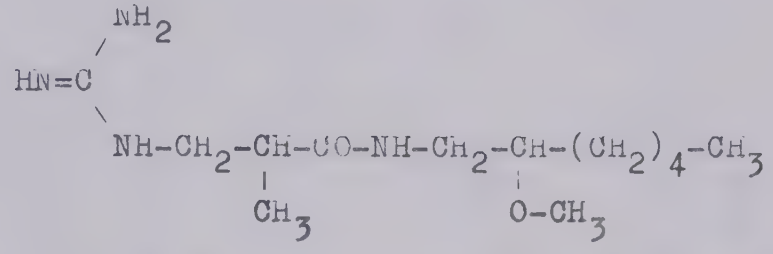
Ainsi il était possible d'attribuer les structures suivantes :

1°) à la phascoline



qui est la N-(3-guanidinopropyl)-2-hydroxy-n-heptylamine

2°) à la phascolosomine



qui est la N-(3-guanidinoisobutyryl)-2-méthoxy-n-heptylamine.

Ces deux structures ont été confirmées par spectre de résonance magnétique nucléaire effectués sur les picrates des deux dérivés guanidiques (Tableau X).

Propriétés optiques de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse

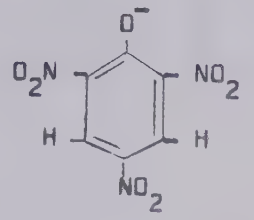
En examinant les structures de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse acide, il apparaissait que la plupart de ces composés possédait des carbones asymétriques dans leur molécule.

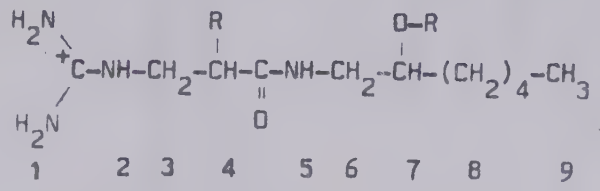
La phascoline, elle-même lévogyre, possédait un atome de carbone asymétrique, se trouvant sur la 2-hydroxy-n-heptylamine ; la phascolosomine, elle-même lévogyre, possédait deux atomes de carbones asymétriques, l'un sur l'acide 3-guanidinoisobutyrique, l'autre sur la 2-méthoxy-n-heptylamine.

Tableau X

SPECTRES DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PICRATES DE PHASCOLINE ET DE PHASCOLOSOMINE

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil VARIAN HA 100 à 100 MHz dans le DMSO-d_6 avec le HMSD (hexaméthyldisiloxane) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont exprimés en p.p.m. ($\delta_{HMSD} = 0$) et les constantes de couplages en Hz ; s,d,t,m désignent respectivement singulet, doublet, triplet, massif.





R	anion picrique	1	2	3	4	5	6	7	8	7
H	8,52(s)	6,95(m)	7,28(t) $J_{2,3} \sim 7$	3,25(m)	2,33(t)	7,85(t) $J_{5,6} \sim 7$	~ 3,00(m)	~ 3,25(m) 4,49(d)(OH) $J_{HCOH} = 5$	~1,20(m)	0,80(m)
CH_3	8,52(s)	6,90(m)	7,22(t) $J_{2,3} \sim 5$	3,10(m)	2,50(m) 0.94(s)(CH_3)	7,90(t) large	3,10(m)	3,10(m) 3,15(s)(O-CH_3)	~1,20(m)	0,78(m)

Les propriétés optiques de ces dérivés ont été étudiées sur les corps isolés après hydrolyse sulfurique ménagée de la phascoline et de la phascolosomine (voir partie expérimentale p.53 pour la phascoline et p.55 pour la phascolosomine). En effet, il était à craindre qu'une racémisation des dérivés ne se produise au cours du chauffage en milieu acide, et cette opération nous permettait de vérifier la rotation de la phascoline et de la phascolosomine avant et après chauffage dans les conditions générales d'hydrolyse.

Les pouvoirs rotatoires des divers composés, déterminés en solution aqueuse à 25°, ont été rassemblés dans le Tableau XI.

Tableau XI

POUVOIRS ROTATOIRES DE LA PHASCOLINE, DE LA PHASCOLOSOMINE ET DE LEURS PRODUITS D'HYDROLYSE

DERIVE	$[\alpha]_D^{25}$ (dans l'eau)
Phascoline	- 8,7° (a)
	- 9,1° (b)
Phascolosomine	-37° (a)
	-34,9° (b)
Acide 3-guanidinopropionique	0°
Acide 3-guanidinoisobutyrique	-14,7°
2-hydroxy-n-heptylamine	- 6,6°
2-méthoxy-n-heptylamine	+34,8°

(a) : non traité

(b) : traité et isolé dans les conditions de l'hydrolyse sulfurique partielle.

Comme le montre le Tableau XI, les pouvoirs rotatoires de la phascoline (-8,7° avant chauffage, -9,1° après chauffage) et de la phascolosomine (-37° avant chauffage, -34,9° après chauffage, ont été peu altérés au cours

du traitement en milieu acide et l'effet de la racémisation peut être considéré comme négligeable. Les deux composés étaient lévogyres, faiblement dans le cas de la phascoline (-8,7°), plus fortement dans celui de la phascolosomine (-37°).

La moitié guanidique de la phascoline, l'acide 3-guanidinopropionique, n'avait pas de carbone asymétrique dans sa molécule et ne possédait donc pas de pouvoir rotatoire. Celle de la phascolosomine, l'acide 3-guanidinoisobutyrique possédait un carbone asymétrique et était lévogyre, avec une rotation optique spécifique de -14,7°.

Les moitiés aminées de la phascoline et de la phascolosomine, la 2-hydroxy-n-heptylamine et la 2-méthoxy-n-heptylamine respectivement, qui possédaient toutes deux un carbone asymétrique et dont la structure ne différait que par l'absence ou la présence d'un groupement méthylique sur la fonction alcool secondaire, différaient tant par le sens que par l'importance de leur pouvoir rotatoire : l'aminoalcool était faiblement lévogyre (-6,6°), tandis que l'aminoéther était fortement dextrogyre (+34,8°).

DISCUSSION

La répartition de la phascoline et de la phascolosomine est assez particulière (Tableau VIII). Ces corps existent en quantité élevée (600 mgr à 1.100 mgr/100 gr de tissu frais) dans le tractus des sipunculiens étudiés ; ils sont aussi présents, à plus faible concentration (90 à 100 mgr/100 gr de tissu frais) dans le muscle de ces animaux. D'ordinaire, les dérivés guanidiques présents dans le tractus des vers ne s'y trouvent qu'en faible proportion, de l'ordre de 5 à 45 mgr/100 gr de tissu frais (31), (21), et le tissu le plus riche en bases guanidiques libres et phosphorylées (phosphagènes) est le muscle, à des taux moyens de 250 à 350 mgr/100 gr de tissu frais (60), (21). En ce qui concerne ce dernier tissu la teneur en guanidines totales phosphorylables (taurocyamine + hypotaurocyamine) du muscle du phascolion et des phascolosomes s'est avérée normale : environ 330 mgr/100 gr de tissu frais. L'anomalie observée chez ces animaux porte donc uniquement sur la présence de quantités considérables, en particulier dans le tractus, des deux nouvelles bases guanidiques, la phascoline et la phascolosomine.

Par leur structure très particulière, les deux nouvelles bases guanidiques des sipunculiens, la phascoline et la phascolosomine, se distinguent de tous les dérivés guanidiques biologiques connus jusqu'ici.

Nous avons vu en effet que ces deux composés résultent de la condensation, en liaison amide, d'un guanidinoacide et d'une amine hydroxylée ou méthoxylée. Cette similarité de structure confère à la phascoline et à la phascolosomine un certain nombre de propriétés communes : les corps sont très basiques, se comportent de la même manière sur les résines échangeuses d'ions, ne cristallisent bien que sous forme de picrate et s'hydrolysent en milieu acide en un dérivé guanidique et un dérivé aminé.

Toutefois, dans leur moitié guanidique comme dans leur moitié aminée, les deux composés présentent des différences significatives, qui se reflètent dans leurs caractères analytiques et dans leurs propriétés spectrales. Il a en effet été montré au cours de ce travail que la phascolosomine possède deux groupements méthyles de plus que la phascoline : l'un des méthyles supplémentaires se trouve branché sur la chaîne carbonée de la fraction guanidique de la molécule (acide 3-guanidinopropionique pour la phascoline, acide 3-guanidinoisobutyrique pour la phascolosomine), l'autre est éthérifié sur la fonction alcool de la fraction aminée (2-hydroxy-n-heptylamine pour la phascoline, 2-méthoxy-n-heptylamine pour la phascolosomine).

L'étude des propriétés optiques de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse, révèle aussi certaines particularités (Tableau XI). Tous ces dérivés sont lévogyres, à l'exception de l'acide 3-guanidinopropionique, qui, ne possédant pas de carbone asymétrique, est dépourvu de pouvoir rotatoire, et de la 2-méthoxy-n-heptylamine, qui est dextrogyre. Ainsi l'aminoalcool du phascolion ($[\alpha]_D^{25} = -6,6°$) et l'aminoéther du phascolosome ($[\alpha]_D^{25} = +34,8°$) sont de signe différent. Des recherches ultérieures permettront de préciser si, chez le phascolosome, la 2-hydroxy-n-heptylamine, qui sert vraisemblablement de précurseur à l'aminoéther est lévogyre, ou si la méthoxylation de cet aminoalcool suffit non seulement à renforcer la rotation optique spécifique de la molécule mais en inverser le sens. Notons également que la phascolosomine, formée de l'acide 3-guanidinoisobutyrique lévogyre ($[\alpha]_D^{25} = -14,7°$) et de la 2-méthoxy-n-heptylamine dextrogyre ($[\alpha]_D^{25} = +34,8°$) est elle-même lévogyre ($[\alpha]_D^{25} = -37°$) ; ceci pourrait s'expliquer par un retournement de la molécule de l'aminoéther au cours de sa condensation avec le guanidinoacide.

L'origine biologique de la phascoline et de la phascolosomine paraît très complexe.

Il est possible que le métabolisme des deux guanidinoacides, l'acide 3-guanidinopropionique et l'acide 3-guanidinoisobutyrique, soit relié à celui des dérivés aminés correspondants, l'acide 3-aminopropionique (β-alanine) et l'acide 3-aminoisobutyrique. Ces deux acides aminés sont formés au cours de la dégradation des pyrimidines dans les tissus animaux : la β-alanine à partir du dihydrouracil en passant par l'acide 3-uréidopropionique, et l'acide 3-aminoisobutyrique à partir de la dihydrothymine en passant par l'acide 3-uréidoisobutyrique (61), (62).

Par contre, les deux amines, la 2-hydroxy-n-heptylamine et la 2-méthoxy-n-heptylamine ne peuvent être directement reliées à aucun composé aminé connu, bien que la structure de la 2-hydroxy-n-heptylamine présente des similitudes avec celle des aminoalcools impliqués dans le métabolisme des phosphoaminolipides.

A notre connaissance aucune amine aliphatique ayant une fonction méthoxyle, comme la 2-méthoxy-n-heptylamine, n'a été rencontrée dans la nature ; seul un acide aminé, la N-méthyl-O-méthyl-sérine, découverte par VILKAS, ROJAS et LEDERER (55), des sucres non aminés et des acides gras tels que des acides mycoliques, entrant dans la constitution des cires semblent posséder une fonction méthoxyle engagée dans une chaîne aliphatique.

RESUME et CONCLUSIONS

En résumé, trois nouvelles guanidines monosubstituées, la thalassémine, la phascoline et la phascolosomine, et un nouveau phosphagène, la phosphothalassémine, ont été isolés des tissus de vers marins (un échiurien et des sipunculiens).

Chez l'échiurien Thalassema neptuni, une nouvelle base guanidique isolée du muscle, la thalassémine, a été cristallisée sous forme de monohydrate, de formule brute $C_8H_{20}N_4O_6P$, H_2O , de point de fusion 184° et de pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -11,2°$. Elle a été identifiée à la guanidinoéthylphospho-O-(α-N,N-diméthyl) sérine, ou α-N,N-diméthyllombricine ; cette structure a été confirmée par synthèse partielle, réalisée à partir de L-lombricine (2-guanidinoéthylphospho-O-sérine). La thalassémine est lévogyre comme la lombricine isolée d'un autre échiurien Urechis caupo, alors que la lombricine provenant du muscle des annélides (oligochètes et polychète) est dextrogyre.

La thalassémine est le quatrième ester de l'acide 2-guanidinoéthylphosphorique trouvé dans le règne animal, les trois autres étant l'ophéline (acide 2-guanidinoéthylméthylphosphorique), la lombricine (2-guanidinoéthylphospho-O-sérine) et la bonellidine (2-guanidinoéthylphospho-O-(β-aspartyl)sérine. La thalassémine est le deuxième dérivé N-substitué de la lombricine trouvé dans la nature, le premier étant la bonellidine (β-aspartyllombricine).

Chez les trois échiuriens étudiés jusqu'ici, les bases guanidiques présentes dans les muscles sont diffé-

rentes d'un animal à l'autre ; toutefois elles ont un caractère commun : elles sont constituées soit par la lombricine elle-même, soit par l'un de ses dérivés N-substitués (bonellidine ou thalassémine).

Des dérivés monométhylés de la sérine, la O-méthyl-N-méthyl-sérine (55) et la N-monométhylsérine (56) ont été rencontrés chez les végétaux. Mais, à notre connaissance, la N,-N-diméthylsérine qui entre dans la composition de la thalassémine n'avait pas jusqu'à présent été mise en évidence dans la nature. L'origine des groupements méthyles substituant l'N de la sérine a été démontrée : de la thalassémine marquée a été obtenue après injection de [$Me^{14}C$] méthionine à des Thalassema neptuni. Le mécanisme de cette N-méthylation de la sérine n'a pu être démontré in vitro, à partir d'ATP, de Mg^{++} et méthionine marquée en présence d'extraits acellulaires de muscle de Thalassema neptuni ; toutefois nous pouvons penser que cette transméthylation se fait par l'intermédiaire de la S-adénosylméthionine, comme dans tous les cas de N-méthylation.

Le nouveau phosphagène musculaire de Thalassema neptuni a été identifié à la N'-phosphoryl-2-guanidino-éthylphospho-O-O(α-N,N-(diméthyl)sérine ; il a reçu le nom de phosphothalassémine. La présence de ce nouveau phosphagène a été confirmée par l'identification d'une nouvelle enzyme spécifique, l'ATP:thalassémine phosphotransférase, responsable de la phosphorylation de la thalassémine. L'activité enzymatique de la thalassémine phosphokinase a été étudiée vis-à-vis de substrats guanidiques non spécifiques comparativement à celle de la lombricine phosphokinase ; les deux enzymes ont une activité plus grande sur la L-lombricine que sur leur substrat naturel, la thalassémine ou la D-lombricine respectivement. Il serait intéressant de faire une étude plus approfondie de l'ATP:thalassémine phosphotransférase et de la comparer aux autres phosphagènekinases, mais les Thalassema sont des animaux très rares et ce travail ne peut être poursuivi.

La phosphothalassémine, isolée du muscle des Thalassema neptuni est le huitième phosphagène rencontré chez les vers ; six d'entre eux sont spécifiques de certains groupes de vers (Annelides, Echiuriens, Sipunculiens). Après la phospholombricine, présente dans le muscle d'Urechis caupo, la phosphothalassémine est le deuxième phosphagène trouvé chez les échiuriens. La répartition des phosphagènes chez les vers est très complexe ; bien que présentant une certaine systématisation, elle ne peut s'expliquer ni par l'habitat, ni par la similitude morphologique des animaux dans un même groupe.

Chez les sipunculiens, deux nouvelles bases guanidiques, la phascoline chez Phascolion strombi, et la phascolosomine chez Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum ont été identifiées. Elles ont été cristallisées sous forme de picrate, de formule brute $C_{17}H_{27}N_7O_9$ pour la phascoline et $C_{19}H_{31}N_7O_9$ pour la phascolosomine. La phascoline a pu être identifiée à la N-(3-guanidino-propionyl)-2-hydroxy-n-heptylamine et la phascolosomine à la N-(3-guanidino-isobutyryl)-2-méthoxy-n-heptylamine ; ces structures ont été confirmées par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

Par hydrolyse acide, ces deux nouvelles bases guanidiques se décomposaient chacune en un guanidinoacide et un dérivé aminé ; ceux-ci ont été identifiés à l'acide 3-guanidinopropionique et à la 2-hydroxy-n-heptylamine pour la phascoline et à l'acide 3-guanidinoisobutyrique et à la 2-méthoxy-n-heptylamine pour la phascolosomine.

L'étude des propriétés optiques de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse a été réalisée ; tous ces produits étaient lévogyres à l'exception de l'acide 3-guanidinopropionique qui n'avait pas de carbone asymétrique et de la 2-méthoxy-n-heptylamine qui était dextrogyre.

Par leur structure très particulière, la phascoline et la phascolosomine se différencient des autres déri-

vés guanidiques jusqu'à présent rencontrés dans la nature. Aucune guanidine monosubstituée composée d'un guanidinoacide et d'une amine, avec formation d'une liaison amide, n'était encore connue ; d'où l'intérêt des deux nouveaux dérivés guanidiques, dont l'originalité réside d'une part dans la présence de liaisons amidiques et, d'autre part, dans la structure des dérivés aminés entrant dans leur composition : la 2-hydroxy-n-heptylamine et la 2-méthoxy-n-heptylamine.

La 2-hydroxy-n-heptylamine se différencie des amines hydroxylées biologiques connues par la longueur de sa chaîne aliphatique. L'éthanolamine qui entre dans la composition des phosphoaminolipides, ou le 2-amino-1-propanol qui fait partie de la structure des alcaloïdes de l'ergot de seigle et le 1-amino-2-propanol de celle de la vitamine B_{12} , ont des structures analogues à celle de la 2-hydroxy-n-heptylamine ; mais ces aminoalcools ont une chaîne aliphatique plus courte.

La 2-méthoxy-n-heptylamine diffère des autres amines aliphatiques biologiques connues, non seulement par la longueur de sa chaîne aliphatique, mais aussi par la nature de sa fonction oxygénée. Un certain nombre de dérivés méthoxylés aliphatiques non aminés sont rencontrés dans la nature ; c'est le cas d'acides gras tels que les acides mycoliques ou de certains sucres méthoxylés. Un seul dérivé aminé méthoxylé aliphatique, la O-méthyl-N-méthylsérine (55), constituant des mycosides, a été trouvé dans la nature ; mais ce dernier est un acide aminé méthoxylé. La 2-méthoxy-n-heptylamine est une amine possédant une chaîne aliphatique saturée, dont les fonctions amine et méthoxy se trouvent sur les carbones 1 et 2 respectivement. A notre connaissance, c'est la première amine méthoxylée de ce type rencontrée dans la nature.

Les acides guanidinopropionique et guanidinoisobutyrique, de structure simple, n'avaient jamais été identifiés libres ou combinés chez les vers.

La phascoline et la phascolosomine présentes en très grande quantité dans les tractus des sipunculiens (600 mgr pour la phascoline et 1.100 mgr pour la phascolosomine) ne participent pas à la formation du phosphagène musculaire. D'une manière générale, les dérivés guanidiques trouvés dans les tractus des animaux sont présents en très petites quantités ; or les quantités de phascoline et de phascolosomine dosées chez les sipunculiens atteignent des valeurs jamais rencontrées jusqu'à présent. De ce fait ces deux nouvelles guanidines monosubstituées doivent jouer un rôle biologique important qui est encore inconnu. Ces deux nouvelles bases guanidiques ont été identifiées chez la plupart des sipunculiens, mais nous ne savons pas si elles sont spécifiques ou non de ce groupe de vers.

Dans un prochain travail, nous rechercherons la présence de la phascoline et de la phascolosomine chez d'autres vers marins. Chez les sipunculiens nous étudierons la vitesse de formation et la vitesse d'élimination des deux nouvelles guanidines monosubstituées.

L'étude de la biogénèse de chaque constituant de la phascoline et de la phascolosomine sera entreprise. Les acides guanidinopropionique et guanidinoisobutyrique pourraient être formés par transamidination de la β-alanine et de l'acide 3-aminoisobutyrique respectivement. Nous avons vu que ces deux acides aminés proviennent de la dégradation des pyrimidines (61), (62); des essais <u>in vivo</u>, à partir d'uracil marqué et de thymine marquée montreront si la biosynthèse des deux guanidinoacides fait suite au catabolisme des pyrimidines. Certains amino-alcools aliphatiques naturels peuvent être le résultat d'une décarboxylation d'acides aminés ; c'est le cas de l'éthanolamine qui provient de la sérine (63) ou du 1-amino-2-propanol de la thréonine (64). Il est possible que la 2-hydroxy-<u>n</u>-heptylamine et la 2-méthoxy-<u>n</u>-heptylamine proviennent d'acides aminés qui seront recherchés dans les tissus des animaux.

Nous rechercherons enfin l'origine du groupement méthyle de la méthoxy-n-heptylamine, à partir de la [$Me^{14}C$]-méthionine, *in vivo*, puis *in vitro* en présence de 2-hydroxy-n-heptylamine isolée de la phascoline. Ces expériences permettront de voir, d'une part si la O-méthylation de l'aminoalcool se fait suivant le mécanisme trouvé chez les végétaux (65) et qui a été démontré dans la formation de l'ophéline (15), et, d'autre part si la 2-hydroxy-n-heptylamine est le précurseur naturel de la 2-méthoxy-n-heptylamine.

BIBLIOGRAPHIE GENERALE DES DERIVES GUANIDIQUES ET DES PHOSPHAGENES (Articles et Revues d'ensemble)

ENNOR, A.H. et MORRISON, J.F.
Biochemistry of the phosphagens and related guanidines
(1958), Physiol. Rev. 38, 631.

THOAI, N.V. et ROCHE, J.
Dérivés guanidiques biologiques
(1960), Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, 18, 83.

THOAI, N.V.
Les dérivés guanidiques, leur rôle biologique
(1960), Coll. Intern. Centre Nat. Rech. Sci. (Paris), 92, Biochimie Comparée des Acides Aminés Basiques, Concarneau, p. 297.

THOAI, N.V. et ROCHE, J.
Phosphagens of marine animals
(1960), N.Y. Acad. Sci., 90, 923.

THOAI, N.V. et ROCHE, J.
Sur la biochimie comparée des phosphagènes et leur répartition chez les animaux
(1964), Biol. Rev., 39, 214.

THOAI, N.V.
Nitrogenous bases
(1965), in Comprehensive Biochemistry, FLORKIN, M. et STOTZ, E.H., éds., vol. 6, p. 208, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York.

THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
Guanidine compounds and phosphagens
(1969), in Chemical Zoology, FLORKIN, M. et SCHEER, B.T., éds., vol. 4, p. 169, Annelida, echiurida, sipunculida, Academic Press, New York and London.

B I B L I O G R A P H I E

1- BISHOP, S.H. et CAMPBELL, J.W.
(1963), Science, 142, 1583

2- CAMPBELL, J.W. et BISHOP, S.H.
(1963), Biochim. Biophys. Acta, 77, 149

3- THOAI, N.V., ROBIN, Y. et OLOMUCKI, A.
Travaux non publiés

4- BERGMANN, M. et ZERVAS, L.Z.
(1927), Z. Physiol. Chem., 172, 277

5- BLOCH, K. et SCHOENHEIMER, R.
(1940), J. Biol. Chem., 134, 785

6- BORSOOK, H. et DUBNOFF, J.W.
(1941), J. Biol. Chem., 138, 384

7- ROSSITER, R.J., GAFFENEY, T., ROSENBERG, H. et ENNOR, A.H.
(1960), Biochem. J., 76, 603

8- THOAI, N.V., ZAPPACOSTA, S. et ROBIN, Y.
(1963), Comp. Biochem. Physiol., 10, 209

9- ROBIN, Y. et AUDIT, C.
(1966), Comp. Rend. Soc. Biol., 160, 1470

10- ROBIN, Y., AUDIT, C. et THOAI, N.V.
(1962), Comp. Rend. Soc. Biol., 156, 1232

11- AUDIT, C., VIALA, B. et ROBIN, Y.
(1967), Comp. Biochem. Physiol., 22, 775

12- ROBIN, Y., AUDIT, C., ZAPPACOSTA, S. et THOAI, N.V.
(1962), Comp. Biochem. Physiol., 7, 221

13- THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1961), Biochim. Biophys. Acta, 52, 221

14- ROBIN, Y., AUDIT, C. et LANDON, M.
(1967), Comp. Biochem. Physiol., 22, 787

15- THOAI, N.V. ROBIN, Y. et AUDIT, C.
(1964), Biochim. Biophys. Acta, 93, 264

16- THOAI, N.V., AUDIT, C. et ROBIN, Y.
(1968), Travaux non publiés

17- THOAI, N.V.
(1957), Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 197

18- PANT, R.
(1959), Biochem., J., 73, 30

19- THOAI, N.V., ROBIN, Y. et PRADEL, L.A.
(1963), Biochim. Biophys. Acta, 73, 437

20- THOAI, N.V., DI JESO, F., ROBIN, Y. et DER TERROSIAN, E.
(1966), Biochim. Biophys. Acta, 113, 542

21- THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1969), in Chemical Zoology, ed. by FLORKIN, M. and SCHEER, B.T. vol. 4. Annelida, echiurida, sipunculida. Acad. Press, New-York & London. P. 169

22- GREENWALD, I.
(1946), J. Biol. Chem., 162, 239

23- BALDWIN, E. et YUDKIN, W.H.
(1950), Proc. Roy. Soc. (London), B136, 614

24- HOBSON, G.E. et REES, H.R.
(1955), Biochem. J., 61, 549

25- THOAI, N.V., ROCHE, J., ROBIN, Y. et THIEM, N.V.
(1953), Biochim. Biophys. Acta, 11, 593

26- ROBIN, Y. et THOAI, N.V.
(1962), Biochim. Biophys. Acta, 63, 481

27- THOAI, N.V., DI JESO, F. et ROBIN, Y.
(1963), Comp. Rend. Acad. Sci., 256, 4525

28- ROBIN, Y., THOAI, N.V., PRADEL, L.A. et ROCHE, J.
(1956), Comp. Rend. Soc. Biol., 150, 1892

29- ROBIN, Y. et AUDIT, C.
(1965), Comp. Rend. Acad. Sci., 260, 7023

30- THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1954), Biochim. Biophys. Acta, 14, 76

31- ROBIN, Y. et ROCHE, J.
(1965), Comp. Biochem. Physiol., 14, 453

32- ROBIN, Y., THOAI, N.V. et ROCHE, J.
(1964), Comp. Rend. Soc. Biol., 158, 1461

33- ROBIN, Y. et THOAI, N.V.
(1961), Comp. Rend. Acad. Sci., 252, 1224

34- ROBIN, Y., THOAI, N.V. et ROCHE, J.
(1957), Comp. Rend. Soc. Biol., 151, 2015

35- THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1959), Biochim. Biophys. Acta, 35, 446

36- ROBIN, Y.
(1964), Comp. Biochem. Physiol., 12, 347

37- THOAI, N.V., REGNOUF, F. et OLOMUCKI, A.
(1967), Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 805

38- THOAI, N.V., ROBIN, Y., DI JESO, F., PRADEL, L.A. et KASSAB, R.
(1964), Comp. Biochem. Physiol., 11, 387

39- ROCHE, J., THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1957), Biochim. Biophys. Acta, 24, 514

40- ROBIN, Y. et GUILLOU, Y.
(1969), Travaux non publiés

41- SCHUTTE, E.
(1943), Z. Physiol. Chem., 279, 52

42- THOAI, N.V. et ROBIN, Y.
(1954), Biochim. Biophys. Acta, 13, 533

43- DESVAGES, G. et THOAI, N.V.
(1968), Comp. Rend. Acad. Sci., 267, 1868

44- THOAI, N.V., PRADEL, L.A. et KASSAB, R.
(1970), in TABOR & TABOR, Methods in Enzymology, vol. XVII, Acad. Press, New-York, P. 1002

45- SAKAGUCHI, S.
(1925), J. Biochem. (Japan), 5, 25, 133, 143

46- ROCHE, J., THOAI, N.V. et HATT, J.L.
(1954), Biochim. Biophys. Acta, 14, 71

47- HANES, C.S. et ISHERWOOD, F.A.
(1949), Nature, 164, 1107

48- AMES, S.R. et RISLEY, H.A.
(1948), Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 69, 267

49- ROSENBERG, H., ENNOR, A.H. et MORRISON, J.F.
(1956), Biochem. J., 63, 153

50- BRAY, G.A.
(1960), Anal. Biochem., 1, 279

51- DUBIN, D.T.
(1960), J. Biol. Chem., 235, 783

52- MALAPRADE, L.
dans "Practical Organic Chemistry". VOGEL, A.I., edit. Longmans, Green and G.O. London. (1956). P. 1070

53- HEILBRON, I., JONES, E.R.H. et SONDHEIMER, F.
(1949), J. Chem. Soc., 605

54- BOWMAN, R.E. et STROUD, H.H.
(1950), J. Chem. Soc., 1342

55- VILKAS, E., ROJAS, A. et LEDERER, E.
(1965), Comp. Rend. Acad. Sci., 261, 4258

56- ELOFF, J.N. et GROBBELAAR, N.
(1969), Phytochemistry, 8, 2201

57- BEATTY, I.M. et MAGRATH, D.I.
(1960), J. Am. Chem. Soc., 82, 4983

58- THOAI, N.V.
(1968), in Homologous Enzymes and Biological Evolution, Thoaï, N.V. and Roche, J., ed., Gordon and Breach, New-York, P. 199

59- BLOCH, K. et SCHOENHEIMER, R.
(1939), J. Biol. Chem., 131, 111

60- MEYERHOF, O.
(1928), Arch. Sci. Biol. Napoli, 12, 536

61- FINK, R.M., FINK, K. et HENDERSON, R.B.
(1953), J. Biol. Chem., 201, 349

62- FINK, K., CLINE, R.E., HENDERSON, R.B. et FINK, R.M.
(1956), J. Biol. Chem., 221, 425.

63 - ELWYN, D., WEISSBACH, A., HENRY, S.S., et SPRINSON, D.B.
(1955), J. Biol. Chem., 213, 281

64 - KRASNA, A.I., ROSENBLUM, C., et SPRINSON, D.B.
(1957), J. Biol. Chem., 225, 745

65- AXELROD, J. et TOMCHICK, R.
(1958), J. Biol. Chem., 233, 702.

========

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

Structure des dérivés guanidiques des vers 2

I) Bases guanidiques 2

II) Phosphagènes 4

Biosynthèse des dérivés guanidiques chez les vers 5

a) Biogénèse de l'arginine 5

b) Biogénèse des autres bases guanidiques 5

- Transamidination 6
- Condensation de l'arginine avec l'acide pyruvique 7
- Décarboxylation 7
- Méthylation 8

c) Biogénèse des phosphagènes 8

Répartition des bases guanidiques et des phosphagènes chez les vers 9

A) Dans les groupes zoologiques 9

- Bases guanidiques 9
- Phosphagènes 10

B) Dans les tissus 12

Rôle biologique des bases guanidiques chez les vers 12

Conclusions et objets des recherches 13

Plan des recherches 14

TECHNIQUES GENERALES D'ETUDE 15

Matériel 15

- Produits chimiques et enzymes 15
- Animaux 16

Méthodes 16

- Traitement des animaux 16
- Techniques d'extraction et de fractionnement 17
- Techniques analytiques 17

A) Chromatographie et électrophorèse 17

a) Chromatographie sur couche mince.. 17
b) Electrophorèse à haut voltage 18
c) Révélation des chromatogrammes et des électrophorégrammes..... 19

Pages

B) Dosages 19

a) Dosage des dérivés guanidiques 19
b) Dosage du phosphagène .....
c) Mesure de la radioactivité 20

Déterminations de structures 20

A) Méthodes chimiques 20

a) Analyse élémentaire 20
b) Etude des fonctions 20
c) Technique de dégradation 20
- Hydrolyse 21
- Oxydation 21

B) Méthodes physiques 21

a) Point de fusion 21
b) Pouvoir rotatoire 21
c) Spectres 21

PREMIERE PARTIE : ISOLEMENT, IDENTIFICATION ET BIOGENESE D'UN NOUVEL ESTER DE L'ACIDE GUANIDINOETHYLPHOSPHORIQUE ET DU PHOSPHAGENE CORRESPONDANT, PRESENTS CHEZ UN ECHIURIEN, Thalassema neptuni 23

Introduction 23

Partie expérimentale 25

- Isolement de la thalassémine des muscles de Thalassema neptuni 25
- Isolement de la phosphothalassémine brute des muscles de Thalassema 26
- Isolement de la L-lombricine du tractus de Thalassema neptuni 27
- Isolement de la D-lombricine des muscles d'Ophelia bicornis 29
- Synthèse de la L-thalassémine 30
- Etude de la spécificité des ATP-thalassémine et lombricine phosphotransférases 31
- Origine des groupements méthyles de la thalassémine 31

Résultats et discussion 33

- Répartition des dérivés guanidiques dans les tissus des Thalassema neptuni 33
- Propriétés et structure de la thalassémine 35

Pages

- Caractérisation de la phosphothalassémine 39
- Caractérisation et propriétés de l'ATP : thalassémine phosphotransférase du muscle de Thalassema neptuni 40
- Origine des groupements méthyles de la thalassémine 42

UXIEME PARTIE : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE DEUX DERIVES GUANIDIQUES NOUVEAUX CHEZ LES SIPUNCULIENS, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum 44

Introduction 44

Partie expérimentale :..... 46

Identification et dosages des dérivés guanidiques dans les tissus des Sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare, Phascolosoma elongatum 46

- Préparation des extraits 46
- Purification et dosages des dérivés guanidiques 46

Muscle 46
Tractus 47

Isolement de la phascoline de Phascolion strombi 47

Isolement de la phascolosomine de Phascolosoma vulgare et de Phascolosoma elongatum 49

Isolement des produits d'hydrolyse de la phascoline 51

Isolement des produits d'hydrolyse de la phascolosomine 53

Résultats :..... 57

Répartition et dosages des dérivés guanidiques dans les tissus des Sipunculiens, Phascolion strombi, Phascolosoma vulgare et Phascolosoma elongatum 57

Propriétés de la phascoline et de la phascolosomine 59

- Phascoline 59
- Phascolosomine 60

Pages

Structure de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse 61

- Identification des produits d'hydrolyse de la phascoline 61

A) Dérivé guanidique 61
B) Dérivé aminé 62

isolement et identification des aldéhydes 64

- Identification des produits d'hydrolyse de la phascolosomine 66

A) Dérivé guanidique 66
B) Dérivé aminé 67

Structure de la phascoline et de la phascolosomine 69

Propriétés optiques de la phascoline, de la phascolosomine et de leurs produits d'hydrolyse 71

Discussion 75

RESUME et CONCLUSIONS GENERALES 78

BIBLIOGRAPHIE 84

=========